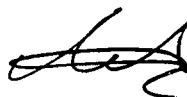


0- 790726

*На правах рукописи*

**СКВОРЦОВ**

**Алексей Николаевич**



**МЕХАНИЗМ ПОСТУПЛЕНИЯ ЦИСПЛАТИНА В КЛЕТКИ  
С УЧАСТИЕМ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА МЕДИ**

03.01.04 – биохимия

03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ**

**2011**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет», Учреждении Российской академии наук Институт цитологии РАН и в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН

**Научные консультанты:**

д.б.н., проф.

Владимир Иосифович Воробьев

д.б.н., проф.

Людмила Валентиновна Пучкова

**Официальные оппоненты:**

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000688193

д.б.н., проф. Кокряков Владимир Николаевич

д.ф.-м.н. Тимковский Андрей Леонидович

д.х.н., проф. Шугалей Ирина Владимировна

**Ведущее научное учреждение:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита состоится «27» декабря 2011 г. в 11.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.022.03 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской Академии медицинских наук Научно-исследовательском институте экспериментальной медицины СЗО РАМН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской Академии медицинских наук Научно-исследовательском институте экспериментальной медицины СЗО РАМН по адресу: 197376 С.-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.

Автореферат разослан

« 7 » ноября 2011 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

Пучкова Л.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Цисплатин и его аналоги – широко используемая в клинической практике группа противоопухолевых препаратов (Lippert, 1999). Их действие основано на повреждении ДНК, индуцированных им функциональных нарушениях, в конечном итоге, приводящих к апоптозу (Sedletska et al., 2005). Основное ограничение применения платиновых препаратов – высокая токсичность, а также тканеспецифическая и приобретенная устойчивость клеток опухолей. Устойчивость к цисплатину может быть обусловлена несколькими механизмами – снижением импорта препарата, увеличением выведения, детоксикацией и повышением емкости репарационных систем. Критическим из этих уровней является поступление препарата в клетку.

Повышение эффективности применения этих препаратов ограничивается отсутствием удовлетворительных объяснений механизма импорта соединений платины в клетки. Цисплатин относится к малым полярным молекулам с большим дипольным моментом. В настоящее время наиболее известны три основных пути поступления этих веществ в клетку: пассивная диффузия, транспорт через транспортер органических катионов OCT2 и транспорт через высокоаффинный импортер меди CTR1 (Hall et al., 2008). Пассивная диффузия не может объяснить вариабельность динамики поступления платины в клетки разных тканей. Белок OCT2 транспортирует цисплатин, но он экспрессируется в очень ограниченном наборе клеток, что не позволяет считать OCT2 универсальным переносчиком цисплатина. В то же время CTR1 экспрессируется во всех клетках на всех этапах онтогенетического развития и исследованные опухоли демонстрируют его повышенную экспрессию (Gupta, Lutsenko, 2009). В 2002 г. впервые показано, что делеция CTR1 приводит к развитию устойчивости клеток к цисплатину (Ishida et al., 2002), а сверхэкспрессия CTR1 – к увеличению импорта платины (Guo et al., 2004). Это было показано в ряде лабораторий на различных объектах и в настоящее время парадигма транспорта цисплатина через CTR1 является общепринятой (Howell, 2010). Это обстоятельство привлекает внимание к белку CTR1, как центральному участнику переноса платиновых препаратов.

CTR1 представляет собой небольшой консервативный эукариотический белок, содержащий три трансмембранных домена и функционирующий в виде стабильного гомотримера. Основное место локализации CTR1 – плазматическая мембрана, его гидрофильный *N*-конец обращен во внеклеточное пространство и содержит три потенциальных медьсвязывающих мотива (Klotz et al., 2002). Остается неясным, каким образом CTR1, высокоселективный по отношению к  $Cu(I)$  транспортный белок, может переносить платиновый комплекс с сильно отличающимися размерами и координационными свойствами. Также неясно, связана ли биологическая функция CTR1 – транспорт меди, с переносом цисплатина, и, если связана, то каким образом? Разработка модели переноса платинового комплекса через CTR1, установление связи между показателями статуса меди (атомной

концентрацией меди, концентрацией церулоплазмينا (ЦП) и оксидазной активностью ЦП в сыворотке крови) и транспортом платины в клетку, а также поиск условий, при которых CTR1 эффективнее импортирует платиновый препарат, могут помочь в разработке новых терапевтических протоколов, характеризующихся меньшей токсичностью, большей эффективностью и специфичностью воздействия. Вышеизложенное определяет **актуальность исследования**, представленного в данной работе.

**Цель работы** – разработка и проверка концепции, объясняющей взаимосвязь статуса меди и CTR1-опосредованного транспорта цисплатина.

Для достижения поставленной цели было намечено решение следующих задач:

1. Осуществить анализ структуры CTR1 в контексте функционирования купрофильного канала и его селективности по отношению к меди(I) и абногенным субстратам (серебро и цисплатин).
2. Проверить на модельных системах *in vitro* взаимодействие координационных соединений платины с нуклеофильными группами белков и ДНК.
3. Оценить корреляцию между тканеспецифической экспрессией CTR1 и квазистационарным уровнем меди, накоплением серебра и поглощением платины.
4. Разработать и охарактеризовать модели млекопитающих с переключаемым статусом меди.
5. Проверить *in vivo* концепцию ко-транспорта меди и платины через CTR1, разработанную на основе строения медьсвязывающих доменов N-конца.
6. Исследовать влияние статуса меди на рост опухолей в различных моделях.

**Научная новизна полученных результатов.** На основе филогенетического и статистического анализа последовательностей белков семейства CTR1, извлеченных из открытых баз данных, молекулярного моделирования и расчета взаимной ориентации доменов создана структурно-функциональная модель гомотримера CTR1 млекопитающих. С учетом результатов анализа медьсвязывающих сайтов с точки зрения концепций координационной химии предложена модель, устанавливающая механизм транспорта цисплатина через CTR1 и его связь с импортом меди. В физико-химических экспериментах, использовавших вновь полученные смешаннолигандные соединения платины и различные классы природных нуклеофилов, подтверждены выводы теоретического анализа и показано, что связывание цисплатина с остатками метионина приводит к быстрому исчезновению его характеристических ДНК-связывающих свойств. На разработанной и охарактеризованной модели лабораторных грызунов с дефицитом церулоплазмин-ассоциированной меди подтверждено, что CTR1 может осуществлять Cu-опосредованный импорт платины, и изменение статуса меди влияет на фармакокинетику цисплатина у грызунов. Продемонстрировано, что снижение показателей статуса меди может подавлять скорость роста ксенотрансплантатных опухолей.

**Научно-практическое значение полученных результатов** состоит в том, что они открывают перспективу для оптимизации протоколов применения



противоопухолевого препарата цисплатина в клинике на основе рационального понимания механизма его транспорта. Полученные результаты расширяют представления о транспорте меди, серебра и платины в организме млекопитающих, а также углубляют знания о механизмах, лежащих в основе нарушения метаболизма меди, ведущих к развитию медь-ассоциированных болезней. Применение разработанных физико-химических моделей позволит изучить тонкие аспекты механизмов взаимодействия платиновых комплексов с биомолекулами. Использование модели животных с изменяемым статусом меди является перспективным для исследования роли меди в возникновении и развитии опухолей, а также их восприимчивости к терапии.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Строение медьсвязывающих сайтов CTR1 обеспечивает селективное связывание и транслокацию меди(I), серебра и платины, что является причиной связи метаболизма меди и чувствительности клеток к цисплатину. Ведущую роль в связывании платины принадлежит метиониновым кластерам внеклеточного N-концевого домена.
2. Метионин и другие серосодержащие лиганды снижают ДНК-связывающие свойства цисплатина *in vitro* за счет лабильзации координационной сферы и потери исходных лигандов препарата.
3. Экспрессия гена CTR1 носит тканеспецифический характер, зависит от уровня внутриклеточной меди и коррелирует с текущей потребностью клеток в меди.
4. У лабораторных грызунов снижение показателей статуса меди может быть достигнуто с помощью Ag-диеты, которая вызывает снижение содержания меди, ассоциированной с церулоплазмином в крови. Однократное введение сульфата меди долгосрочно восстанавливает показатели статуса меди.
5. Статус меди, скорость роста опухолей и перенос цисплатина в клетки связаны между собой.

**Апробация результатов работы.** По теме диссертации опубликовано 15 статей в рецензируемых журналах, из которых 13 – в журналах, включенных в список ВАК РФ. Результаты были представлены на следующих конференциях: 11th International Symposium on Metal ions in Biology and Medicine (Кембридж, Великобритания, 2011, устный доклад); 4th International FESTEM Symposium in Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology (Санкт-Петербург, 2010, устный доклад); 12<sup>th</sup> International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry (Антверпен, Бельгия, 2010); VI Съезде Российского общества Медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010); 7th Winter Symposium on Chemometrics (Санкт-Петербург, 2010); 13, 11, 10 и 9 Пушкинских конференциях молодых ученых «Биология-Наука XXI века» (Пушино, 2009, 2007, 2006, 2005 устное сообщение); 5 съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009); XXIV Международной Чугаевской конференции по координационной химии (Санкт-Петербург, 2009); 38<sup>th</sup> International Conference on Coordination Chemistry (Иерусалим, Израиль, 2008); конференции «Актуальные вопросы структурной и клеточной биологии»

(Санкт-Петербург, 2008, устный доклад), международном симпозиуме «Modern Spectroscopy Methods in Studying Structure and Function of Biopolymers in Biology and Medicine» (Дубна, 2007); BioSysBio 2007 System Biology, Bioinformatics and Synthetic Biology (Манчестер, Великобритания, 2007); II International Conference. From Physics to Biology: the interface between experiment and computation (BIFI-2006) (Сапатога, Испания, 2006); XIII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, 2006, устный доклад); XIII Симпозиуме по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул (Санкт-Петербург, 2006, устный доклад); FEBS Forum for Young Scientists и 3rd FEBS Congress (Стамбул, Турция, 2006 устный доклад) и III съезде биофизиков России (Воронеж, 2004, устный доклад).

**Личный вклад автора.** Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследований, дизайне работы, получении, интерпретации и описания полученных результатов. Данные о метаболизме меди в молочной железе и в отделах мозга, полученные соответственно Гюлихановой Н.Е. и Бабиц П.С., использованы в диссертации для обобщающего анализа. Это отмечено в подписях к рисункам. При работе над темой автором подготовлены 3 кандидатские диссертации.

**Структура диссертации.** Рукопись содержит введение, шесть глав, заключение и выводы, описание материалов и методов и список цитируемой литературы. Диссертация изложена на 256 страницах, включающих библиографию (232 источника, из которых 210 на английском языке), 15 таблиц и 93 рисунка.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы крысы линии Вистар, мыши линий C57Bl, CD-1 и *Apc<sup>Mln</sup>*; клеточные культуры линий HCT116 и SKOV3; антитела к ЦП человека и крысы, антитела к пептидам, соответствующим участкам белков CTR1 и ATP7B; а также антитела фирмы «Abcam» (США) к Cu/Zn-супероксиддисмутазе (SOD1), субъединице 4 изоформы 1 цитохром-с-оксидазы (COX, Cox4i1), VDAC (вольт-зависимого анионного канала митохондрий), HTRA2 (устойчивой к нагреванию протеазы митохондрий), p53, цитохрому c и  $\beta$ -актину. Цисплатин, *транс*-ДДП, фирмы «Sigma»; оптически-активные лиганды и содержащие их комплексы платины синтезированы по опубликованным методикам. **Выделение субклеточных фракций** гомогената клеток, проводили методом дифференциального или равновесного центрифугирования (Васин и др., 2005). **Тотальную РНК выделяли** с использованием «TRIzol Reagent». **Синтез кДНК в реакции обратной транскрипции** (ОТ) проводили на тотальной РНК со случайными праймерами, как описано ранее (Васин и др., 2004). **ПЦР** на полученной кДНК проводили со специфическими праймерами для CTR1, ЦП, ГФИ-ЦП (ЦП, связанного с плазматической мембраной через гликозилфосфатидилинозитоловый якорь), COX, SOD1 и  $\beta$ -актина, согласно опубликованной методике (Клотченко и др., 2008). Для **полукolicественной характеристики экспрессии** генов использовали соотношение между уровнем мРНК исследуемого гена и мРНК  $\beta$ -актина (Marone et al., 2001). **Концентрацию ДНК, РНК и белков** определяли спектрофотометрически (Nanodrop-2000, США). **Гель-электрофорез** ПЦР-продуктов проводили в 1% агарозном геле с визуализацией бромидом этидия. **Электрофорез белков** проводили в ПААГ в неденатурирующих условиях или в присутствии 0.1%-ного DCH по методу Laemmli (1970), или в 1% агарозном геле. **Перенос белков** из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли полусухим методом или в буфере. **Специфические иммунные комплексы** выявляли после гибридизации со вторым

антителами, конъюгированными с пероксидазой, с помощью хемилюминесцентных проявителей. *Оксидазную, феррооксидазную и супероксиддисмутазную активности* определяли по окрашиванию электрофоретических зон в геле в реакциях с высокоспецифическими абиогенными хромогенными субстратами. *Активность СОХ* оценивали полярографически по потреблению кислорода митохондриями. *Фотометрирование гелей* осуществляли путем анализа сканированных/сфотографированных цифровых изображений программой Scion Image. *Концентрации металлов* измеряли методом атомной абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией и зеемановской коррекцией (4100ZL Perkin-Elmer, США). *ЦП выделяли* методом ионообменной хроматографии. Для *характеристики фракций ЦП* использовали спектроскопию поглощения и кругового дихроизма (КД) в УФ- и видимом диапазонах, а также дифференциальную сканирующую калориметрию. Для *подтверждения строения* полученных соединений платины и исследования кинетики реакций замещения лигандов в комплексах платины использовали спектроскопию ЯМР  $^1D$ , DQF-COSY и GHSQC  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{31}P$ ,  $^{195}Pt$  (C-200, WM-400, Bruker, Германия; S-700, Varian, США), рентгеноструктурный анализ (Syntex P-1, Enraf-Nonius CAD4), спектроскопию поглощения (Specord M40, M400, Carl Zeiss, Германия) и КД (Mark-V, Jobin-Yvon, Франция) в УФ-диапазоне. *Кинетику реакций* исследовали в герметически закрытых кюветах путем мониторинга изменений спектра. *Количественный анализ кинетических данных* проводили с помощью многомерного разрешения кривых (метод главных компонент, эволюционный факторный анализ, регрессия кинетических кривых на главные компоненты) с помощью авторского программного обеспечения на базе библиотеки ALGLIB ([www.alglib.org](http://www.alglib.org)). Последовательности CTR1 позвоночных были извлечены из открытых баз данных NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) с использованием алгоритма BlastP (NCBI). Для *анализа последовательностей* использовали программы ClustalX 2.0 ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)), Multalin ([multalin.toulouse.inra.fr/multalin/](http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/)), Cobalt (NCBI), PHYLIP ([evolution.genetics.washington.edu/phylip](http://evolution.genetics.washington.edu/phylip)). PSIPRED 3.0 и MEMSAT-SVM/MEMSAT3 с сервера PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). *Расчеты геометрии молекулярных структур и энергий взаимодействия* были выполнены с использованием метода молекулярной механики MM+, и квантово-химических расчетов (полумэмпирический в параметризации ZINDO/1 и ab initio RHF в базисе 6-31G\*; без учета растворителя). Для *характеристики белок-белковых взаимодействий* (докинга) между возможными донорами и акцепторами меди для CTR1 использовалась программа Hex 4.5. Молекулярные структуры белков извлечены из открытой базы PDB (NCBI). Визуализация молекулярных структур проведена с использованием программ Mercury 1.2.1, Platon, RasMol 2.7. *Мета-анализ литературы* производили на основе открытой реферативной базы данных NCBI Medline.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Анализ последовательности высокоаффинного транспортера меди CTR1 в контексте предпосылок связывания меди, серебра и платиновых препаратов

С целью выявления консервативных в эволюции свойств, указывающих на функциональное назначение сайтов и доменов CTR1, а также выявления предпосылок связывания этим белком нетипичных субстратов – ионов Ag(I) и цисплатина, в работе проведен филогенетический и структурно-функциональный анализ последовательностей белка CTR1 позвоночных (EEN65462, AAN67161, CAG01694, CAF34419, ACN11071, AAN75178, AAN67952, CAD13301, XP\_001506031, XP\_002743257, XP\_001103110, XP\_520197, AAB66306, SAN91134, XP\_001489029, XP\_538800, EFB15518, AAI50135, AAL49494, XP\_002708160, ADP09413, AAN34674, AAF72546, XP\_001364740, XP\_001232515, XP\_002194656).

Последовательность CTR1 позвоночных условно разделяется на относительно вариабельную по первичной структуре и не поддающуюся информативному выравниванию *N*-концевую часть (аминокислотные остатки (а. о.) до 44 по нумерации а. о. CTR1 человека), соответствующую внеклеточному *N*-концевому домену, и высококонсервативную *C*-концевую часть, не содержащую в эволюции позвоночных вставок и делеций, и включающую три трансмембранных домена (ТМД) и внутриклеточные участки. Алгоритмы анализа ТМД (PsiPred) во всех последовательностях предсказывают ТМД2 и ТМД3, разделенные короткой (3 а. о.) внеклеточной петлей и содержащие наиболее консервативную часть последовательности. ТМД2 содержит ряд консервативных а. о. с нуклеофильными боковыми группами, которые находятся по одну сторону потенциальной  $\alpha$ -спирали, в него входят ключевые остатки M150 и M154, другая сторона  $\alpha$ -спирали консервативно гидрофобна. Потенциальная  $\alpha$ -спираль ТМД3 также четко поляризована по консервативности а. о. На основании этих наблюдений построена модель, согласно которой в гомотримере CTR1 образуется тригональный канал из шести  $\alpha$ -спиралей, образованный ТМД2 и ТМД3, внутрь которого обращены нуклеофильные остатки ТМД2, а ТМД1 в образовании поры не участвует (Самсонов и др., 2006; Рис 1-а). Тригональная канальная геометрия транспортера, размещение ТМД в мембране и положение ключевых остатков Met получили подтверждение в электронно-микроскопических исследованиях (De Feo et al., 2009), с тем отличием, что ТМД1 и ТМД2 наклонены в мембране. В связи с этим, ТМД1, предсказываемый в положениях 67–86 (20 а. о.) должен быть длиннее. Анализ профиля гидропатии показывает, что ТМД1 может быть продолжен в сторону *N*-конца до длины 25–33 а. о. Со стороны *C*-конца ТМД1 ограничен группой из 5 консервативных положительно-заряженных аминокислот, этот участок, возможно служит для направления CTR1 в мембрану, так как ни одна из проанализированных последовательностей не содержит сигнальных участков для встраивания белка в мембрану по механизму, соответствующему концепции Г. Блобела.

Избирательность и аффинность CTR1 по отношению к транспортируемым металлам, обеспечивается металлсвязывающими остатками *N*-конца. У позвоночных эти а. о. собраны в три мотива: Met/His-богатый (мотив 1), His-богатый (мотив 2) и Met-богатый (мотив 3) (последовательности мотивов CTR1 человека показаны на рис. 3). Мотивы хорошо прослеживаются в проанализированных последовательностях. Каких-либо других специальных консервативных участков или сайтов, типичных для медьсвязывающих белков, выявлено не было. Таким образом, для функционирования *N*-концевого домена важна не конкретная последовательность аминокислот, а ее свойства, которые сохраняются в эволюции. Во-первых, последовательность сильно обогащена остатками Met и His, которые у многих видов собраны в tandemные повторы. Во-вторых, общий заряд *N*-конца отрицательный, что благоприятствует электростатическому притяжению катионов. В-третьих, *N*-конец, несмотря на высокое содержание остатков Met, обладает гидрофильными свойствами.

Наконец, в *N*-конце, по-видимому, отсутствует какая-либо упорядоченная вторичная структура (наличие вариабельных в эволюции полиглициновых трактов и остатков Pro), и он обладает высокой конформационной подвижностью. Остатки Cys в *N*-концевом домене практически не встречаются и, следовательно, дисульфидные связи не требуются для формирования функционального гомотримера.

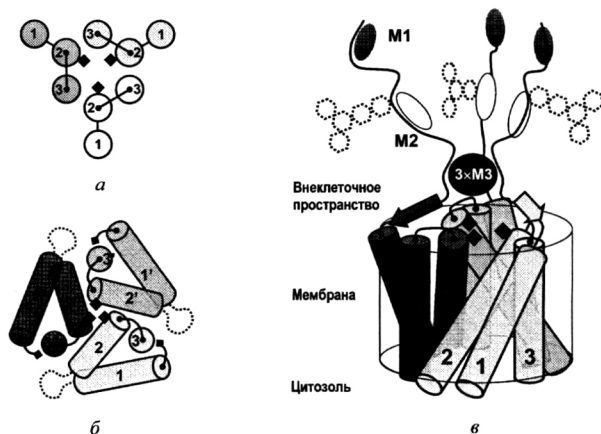


Рис. 1. (а) гипотетическое расположение ТМД, предсказанное на основании амфипатических свойств  $\alpha$ -спиралей; (б) расположение  $\alpha$ -спиралей ТМД на основании электронно-микроскопических данных De Feo с соавт. (2009), вид с внеклеточной стороны; (в) возможное расположение нуклеофильных сайтов относительно медьпроводящего канала на основании предсказанных свойств последовательностей CTR1. (♦) – ключевые остатки  $M^{154}$ , пунктир - положение сайта *N*-гликозилирования у млекопитающих.

Согласно концепции химической жесткости Р. Пирсона Cu(I) является мягким электрофилом, а Cu(II) – промежуточным (Табл. 1), согласно этой же концепции мотивы 2 и 3 *N*-конца CTR1 идеально подходят для связывания Cu(II) и Cu(I) соответственно (тиоэфир Met – мягкий нуклеофил, имидазол His – промежуточный). Координация меди в мотивах приводит к стабилизации соответствующих состояний окисления. Таким образом, мотивы 2 и 3 CTR1 позвоночных могут способствовать восстановлению меди без участия специфических редуктаз (у позвоночных не обнаруженных), подобно тому, как это происходит в белке CopC из *P. aeruginosa*, в котором восстановление меди сопряжено с транслокацией иона из His-сайта в Met-сайт. Координация Cu(I) только остатками Met, до недавних пор считавшаяся неэффективной, обнаружена во многих белках, мотивы 1 и 3 CTR1 могут быть отнесены к таким сайтам.

Исследование последовательности CTR1 показывает, что пространственная организация CTR1 допускает сближение Met-богатых мотивов трех субъединиц друг с другом и с устьем канала, в результате чего боковыми группами остатков Met образуется гидрофобная нанокляпка тиоэфира (рис. 1-в). Ион Cu(I) "растворяется" в этой капле и стабилизируется в восстановленном состоянии,

при этом конкретное размещение остатков Met в последовательности не важно, а важно сохранение их количества.

Таблица 1. Сравнение характеристик рассматриваемых субстратов CTR1

Элемент	медь		серебро	платина	
Состояние	Cu <sup>+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Ag <sup>+</sup>	Pt <sup>2+</sup> "водный ион"	Pt(II) аминохлоро- комплексы
Электронная конфигурация	[Ar]3d <sup>10</sup>	[Ar]3d <sup>9</sup>	[Kr]3d <sup>10</sup>	[Xe] 4f <sup>14</sup> 5d <sup>8</sup>	
ковалентный радиус, Å	1.32		1.45	1.36	
ионный радиус / размер молекулы, Å, {координационное число}	0.46 {2} 0.60 {4} 0.77 {6}	0.57 {4} 0.73 {6}	0.67 {2} 1.0 {4} 1.2 {6}	0.6 {4} 0.8 {6}	6.0×6.0×3.0 (цисплатин)
электроотрицательность по Полингу	1.90	2.00	1.93	2.28	
жесткость по Пирсону, эВ	6.3	8.3	6.9	–	1.4 (цисплатин) 1.7 (карбоплатин) 1.3 (оксалиплатин)
стандартный ОВ потенциал восстановления в водной среде, В	+0.521 (1e <sup>-</sup> )	+0.153 (1e <sup>-</sup> )	+0.7996 (1e <sup>-</sup> )	+1.18 (2e <sup>-</sup> )	+0.755 (2e <sup>-</sup> ) [PtCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup>
стандартный ОВ потенциал окисления в водной среде, В	+0.153 (1e <sup>-</sup> )	+2.4 (1e <sup>-</sup> )	+1.98 (1e <sup>-</sup> )	–	+0.68 (2e <sup>-</sup> ) [PtCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup>

Примечание: При составлении таблицы для жесткости по Пирсону, атомных и ионных радиусов и прочих характеристик использованы данные литературы.

Меньшие значения хелатного эффекта при таком статистическом связывании способствуют дальнейшему переходу иона в более ригидное координационное окружение M154/150 в устье канала. Сохранение в эволюции CTR1 позвоночных относительной длины и трех мотивов, из которых только мотив 3 необходим для комплементации медьтранспортной функции у дрожжей, указывает, что мотивы 1 и 2 необходимы для принятия меди от внеклеточного донора. Методом молекулярного докинга нами выявлено, что мотивы 1 и 2 N-конца CTR1 могут связываться с участком молекулы церулоплазмينا, основного внеклеточного донора для клеток негепатоцитарных рядов, в непосредственной близости от лабильного атома меди. Дополнительно мы произвели расчет энергий связывания Cu(I) с C-концевым доменом CTR1 и Cys-x-x-Cys последовательностью внутриклеточных медных шаперонов. Результаты показывают, что CTR1, помимо выполнения чисто канальной функции, теоретически может связывать неупакованную медь (в кишечнике), принимать медь от всех известных физиологических доноров, способствовать ее восстановлению, и передавать ее напрямую внутриклеточным шаперонам (Рис. 2). При этом селекция меди от других похожих биогенных субстратов (Zn(II), Fe(II)), по-видимому, осуществляется по неспособности последних восстанавливаться и переходить в более мягкое (по Р. Пирсону) состояние, стабилизируемое мотивом 3.

Абиогенные ионы  $\text{Ag(I)}$ , изоэлектронные с  $\text{Cu(I)}$ , которые транспортируются CTR1 почти с равной эффективностью, наиболее вероятно, связываются напрямую с мотивом 3 и далее переносятся по той же цепочке нуклеофильных

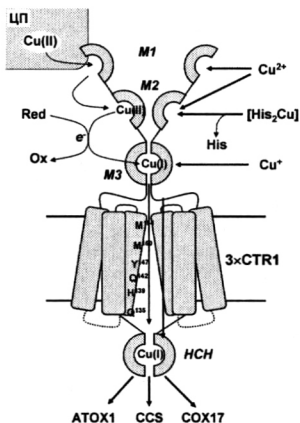


Рис. 2. Гипотетический механизм транспорта меди через CTR1, предлагаемый на основе анализа особенностей его структуры. Для наглядности изображены только две из трех субъединиц гомотримера, топологическое положение внутриклеточной петли обозначено пунктиром.

обогащения остатками Met делает *N*-конец CTR1 идеальной мишенью платинирования. Однако закономерности реакций комплексов платины(II) (см. ниже, п. 3) предполагают, что связывание платинового комплекса в окружении большого числа тиоэфирных групп в мотиве 3 *N*-конца CTR1 должно быстро становиться необратимым и приводить к потере всех исходных лигандов препарата и, как следствие, его уникальных ДНК-связывающих свойств. Поскольку цисплатин должен переноситься как функциональная группа, а не как “свободная” платина(II), он не может транспортироваться аналогично  $\text{Cu(I)}/\text{Ag(I)}$ . Малый размер молекулы цисплатина и нежесткость канала CTR1 допускают ее прохождение через канал. Проблему представляет необходимость расщепления относительно прочных монодентантных связей  $\text{Pt-S}$  до того, как произойдет необратимое связывание, инактивирующее и препарат и транспортер. Для того чтобы разрешить противоречие между необратимым связыванием цисплатина с Met-богатыми мотивами *in vitro* и хорошо подтвержденным наличием его транспорта через CTR1 *in vivo*, мы предположили, что импорт цисплатина осуществляется за счет потока меди, непрерывно переносимой транспортером *in vivo* (рис. 3). При этом мы опирались на наблюдения, что ионы меди способны каталитически расщеплять связи  $\text{Pt-S}$  (Cheng et al., 1998). В этом контексте CTR1 переносит цисплатин не как “высокоаффинный транспортер”, а потому, что его внеклеточный домен,

увеличенный размер иона  $\text{Ag(I)}$  не является препятствием, так как остатки Met имеют большую конформационную подвижность (по сравнению с His и Cys). Таким образом, транспорт серебра через CTR1 подтверждает предположение, что CTR1 избирательно связывает катионы с низкой жесткостью. Платиновые препараты, в том числе цисплатин, перед связыванием с большинством биомолекул должны пройти стадию активации, в результате которой образуется реакционноспособный комплекс — катион и мягкий электрофил. Активированный комплекс кинетически предпочтительно взаимодействует с остатками Met, которые доступны растворителю. Поэтому сочетание гидрофильных свойств, отрицательного заряда и

во-первых, Met-богатый, гидрофильный и отрицательно заряженный и, во-вторых, содержит ионы меди, постоянно поставляемые *in vivo* внеклеточными донорами.

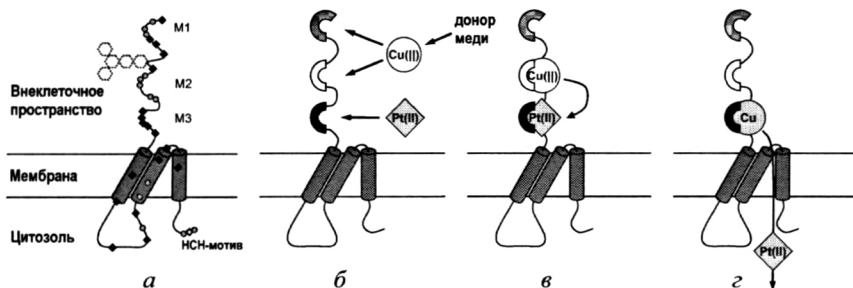


Рис. 3. Гипотетический механизм транспорта цисплатина через CTR1 с участием меди (для наглядности указана только одна из субъединиц гомотримера). Распределение нуклеофильных остатков – гистидина (кружки) и метионина (ромбы) в последовательности hCTR1 (а). Цисплатин предпочтительно связывается с Met-богатым мотивом 3, в то время как медь(II), поставляемая внеклеточным донором, связывается с His-богатыми мотивами 1 и 2 (б). Медь перемещается из мотива 2 в мотив 3 (в), катализируя расщепление платинового аддукта и предотвращая его необратимое полидентатное связывание с транспортером, в результате платиновый комплекс проходит через медьпроводящий канал (г).

Из гипотезы следует, что CTR1 функционирует как Cu-опосредованный импортер платины, и в определенных условиях скорости поступления меди и платины в клетки могут положительно коррелировать. Это создает определенные перспективы регулирования поступления цисплатина в клетки путем воздействия на транспорт меди.

## 2. Тканеспецифическая экспрессия гена CTR1 у млекопитающих

Рациональное использование связи метаболизма меди с транспортом противоопухолевых платиновых препаратов требует знания взаимосвязи между экспрессией гена *CTR1* и физиологическим состоянием клеток. Для того чтобы выявить подобную связь *in vivo*, в работе использованы природные модели с установленными различными типами метаболизма меди. В качестве таких моделей были выбраны:

(1) печень и мозг новорожденных и взрослых крыс (органы характеризуются, соответственно, эмбриональным и взрослым типами метаболизма меди, которые сменяются в строго определенный период онтогенетического развития (Harley et al., 1980));

(2) молочная железа беременных и лактирующих крыс (в указанные периоды метаболизм меди в ней выполняет разные функции: в течение беременности обеспечивает нормальный рост быстро делящихся клеток; в течение лактации к этой функции добавляется пищевая для новорожденных (Platonova et al, 2007));

(3) сердце новорожденных и взрослых крыс (орган с самым высоким уровнем внутриклеточных купроэнзимов (COX));



(4) аденомы кишечника, спонтанно развившиеся у мышей линии *Arc<sup>Min</sup>* (пример клеток с быстрым нерегулируемым ростом, нуждающихся в повышенном содержании всех метаболитов, включая медь);

(5) органы взрослых мышей линии C57Bl.

В клетках перечисленных моделей методом полуколичественной ОТ-ПЦР определен относительный уровень экспрессии гена *CTR1*, по величине которого судили об интенсивности импорта меди. В этих же тканях была определена концентрация меди, которая служила показателем содержания внутриклеточных купроэнзимов и величине пула депонированной меди. Помимо этого, была определена активность гена ЦП, которую определяли по относительному содержанию зрелых мРНК обеих сплайс-форм (Patel et al., 2000). По этому параметру судили об уровне синтеза секреторных купроэнзимов. Перечисленные показатели использовали для оценки *метаболизма меди*. В тех случаях, когда клетки формируют внеклеточные жидкости (плазму крови, молоко, желчь, ликвор), в последних определяли четыре параметра: атомную концентрацию меди, концентрацию меди, ассоциированной с ЦП, содержание иммунореактивного ЦП и оксидазную активность, или, по возможности, какой-либо из них. Совокупность этих показателей, *статус меди*, использовали для количественной оценки внеклеточного баланса меди в организме.

*Экспрессия гена CTR1 в печени* определена в разные периоды онтогенетического развития. Это связано с тем, что в период эмбрионального и раннего постнатального развития (у крыс до 13 дня жизни) метаболизм меди в печени имеет эмбриональный тип. В этот период медь, поступающая в печень, накапливается в гепатоцитах до концентраций, на порядок больших, чем у взрослых млекопитающих. Активность гена ЦП в печени низка, концентрация ЦП и меди в крови в несколько раз ниже, чем у взрослых. Переход на взрослый тип метаболизма меди сопровождается резким снижением содержания меди в печени, повышением активности гена ЦП в гепатоцитах и увеличением концентрации меди и ЦП в крови. В работе показано, что в первые дни после рождения медь аккумулируется в ядрах, к 6-ому дню концентрация меди в них падает и повышается в лизосомах, где она растет до 12-дневного возраста и затем резко снижается. При высокой концентрации меди в ядрах, активность гена *CTR1* снижается в 8 раз, а накопление меди в лизосомах продолжается. Внутриклеточное перераспределение меди осуществляется при низкой активности гена ЦП, которая потом возрастает у взрослых на порядок. На фоне высокого содержания ЦП в крови взрослых животных экспрессия гена *CTR1* вновь устанавливается на высоком уровне.

*В отделах мозга новорожденных и взрослых крыс* был измерен уровень экспрессии генов *CTR1* и ЦП, и определено содержание меди. В рассмотрение взяты 7 различных отделов мозга: кора, мозжечок, гиппокамп, миндалевидное тело, гипофиз, гипоталамус и сосудистое сплетение на 5-й, 10-й, 20-й, 30-й и 120-й день жизни. Результаты показали, что в течение онтогенеза в коре, гиппокампе, миндалевидном теле, мозжечке, гипофизе и гипоталамусе происходит прогрессивное увеличение концентрации меди. У взрослых крыс

кора, мозжечок и гиппокамп по концентрации меди между собой различаются мало. В этих отделах она в 2 раза ниже, чем в гипофизе и гипоталамусе. Существенные изменения концентрации меди в течение исследуемого периода происходят в сосудистом сплетении. Эти изменения сходны с таковыми в печени при смене типов метаболизма меди. Так, в сосудистом сплетении у новорожденных крыс концентрация меди при рождении почти в 20 раз выше, чем у взрослых, и медь продолжает накапливаться до 20-го дня жизни. Затем она падает, достигая у взрослых самого низкого уровня по мозгу. Активность гена *CTR1* существенно повышается в течение развития в клетках гипоталамо-гипофизарной системы. В сосудистом сплетении, которое играет ведущую роль в поддержании баланса меди в мозгу, как и в печени, с возрастом уровень *CTR1*-мРНК повышается. У новорожденных в гипофизе и гипоталамусе преимущественной изоформой продукта транскрипции гена ЦП является секреторный ЦП. У взрослых животных – мРНК ГФИ-ЦП. Соотношение изоформ ЦП-мРНК в сосудистом сплетении остается примерно одинаковым. Содержание ЦП в ликворе, который является в основном продуктом клеток сосудистого сплетения, не зависит от его колебаний в сыворотке крови при смене типов метаболизма меди и составляет около 3 мг/л, что почти в 100 раз меньше, чем в сыворотке крови взрослых крыс. На всех этапах развития на 1 молекулу ЦП ликвора приходится примерно 10 атомов меди.

В клетках молочной железы беременных крыс образуется мРНК, программирующая синтез ГФИ-ЦП, а в период лактации – мРНК секреторного ЦП. Максимальная активность гена *CTR1* совпадает с началом лактации и в течение всего этого периода она пропорциональна содержанию меди в молоке, основная часть которой включена в ЦП. Содержание меди в молоке регулируется активностью гена ЦП, которая снижается по мере лактации.

В сердце периоду увеличения массы органа соответствует высокий относительный уровень *CTR1*-мРНК, который к 120-му дню жизни падает в 5 раз.

В аденомах *Apc<sup>Min</sup>*-мышей с генетически обусловленным развитием опухолей кишечника экспрессия гена *CTR1* достоверно увеличивается в ряду: стенка кишечника мышей *C57Bl* → стенка кишечника *Apc<sup>Min</sup>*-мышей → аденома.

Экспрессия гена *CTR1* и содержание меди в органах взрослых мышей линии *C57Bl* была сопоставлена с атомной концентрацией меди (Рис. 4). Органы можно условно разбить на группу с высоким уровнем экспрессии гена *CTR1* (печень, почки), низким (скелетные мышцы, селезенка) и промежуточным. Корреляция между уровнем экспрессии *CTR1* и концентрацией меди слабая (критерий *r* Пирсона +0.33, критерий *p* Спирмена +0.59). В надпочечниках концентрация меди необычно высока; после исключения образцов надпочечников *r*- и *p*-критерии составляют +0.49 и +0.56.

Суммируя результаты этой части работы можно заключить следующее:

1). Связь между типом метаболизма меди и уровнем экспрессии гена *CTR1* существует и носит органоспецифический характер. Уровень экспрессии гена *CTR1* определяется текущей потребностью клеток ткани в меди, которая складывается из затрат на формирование внутриклеточных купроэнзимов,

синтез секретируемых купроэнзимов и создание депо меди. При этом существует механизм, подавляющий экспрессию *CTR1* при высоком содержании меди в ядре.

2). Корреляция между уровнем экспрессии гена *CTR1* и концентрацией меди в органах положительна, но менее выражена, чем взаимосвязь между экспрессией *CTR1* и потребностью клеток в меди. Это объясняется тем, что, концентрация накопленной меди в органе не всегда однозначно связана с его текущей потребностью в меди.

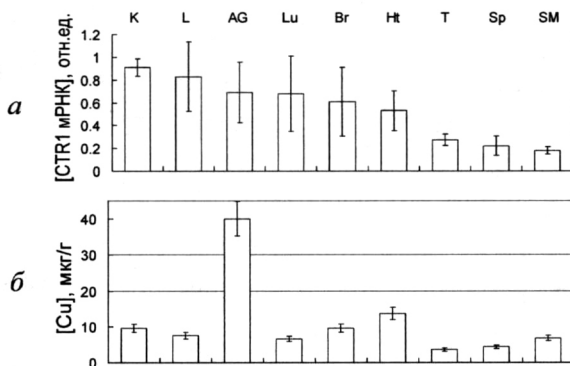


Рис. 4. Квазистационарный уровень экспрессии мРНК *CTR1* в органах мышей C57Bl (а) и атомная концентрация меди в тех же органах (б). Обозначения: К – почки, L – печень, AG – надпочечники, Lu – легкие, Br – мозг, Ht – сердце, T – семенники, Sp – селезенка, SM – скелетные мышцы. Указано стандартное отклонение в группе животных.

3). Закономерности экспрессии гена *CTR1* в печени, отделах мозга, лактирующей молочной железе и в сердце в течение онтогенетического развития крыс полностью соответствуют концепции, что белок *CTR1* является наиболее значимым *in vivo* импортером меди в клетках млекопитающих.

4). Статус меди и уровень экспрессии гена *CTR1* взаимосвязаны.

### 3. Взаимодействие платиновых комплексов с *S*-донорами и ДНК

Характерное время реакций замещения лигандов в координационных соединениях платины, лежащих в основе биологического действия платиновых препаратов, достаточно велико. Поэтому кинетика и механизмы многих из этих реакций могут быть исследованы в модельных системах физико-химическими методами. Для исследования релевантных моделей с низкими концентрациями платины использовали и усовершенствовали методику, базирующуюся на сочетании спектроскопии собственного УФ-поглощения и кругового дихроизма (КД) лигандов и методов хеометрики (многомерного разрешения кривых, МРК). В работе использовали цисплатин и другие соединения платины, в том числе – вновь синтезированные и охарактеризованные (Табл. 2, Рис. 5).

Динамические свойства комплексов платины с *S*-донорными лигандами исследовали методом спектроскопии ЯМР, поглощения и КД на серии сульфоксидных и тиодигликолевых комплексов (Табл. 2). В полном

соответствии с концепцией *транс*-эффекта лиганд в положении *in trans* к *S*-донору обменивается быстро. В частности, динамический обмен Cl<sup>-</sup> и воды при гидролизе таких комплексов происходит за секунды (для сравнения – равновесие гидролиза цисплатина устанавливается при тех же условиях с характерным временем ~2 ч).

Таблица 2. Комплексы платины, использованные в работе

Комплекс *	изомеры †	Литературный источник
[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	<b>c, t</b> стабильны	
(-)-[Pt(MTSO) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	<b>c</b> ← <b>t</b>	Спевак и др, 1992
(-)-[Pt(MTSO)PyCl <sub>2</sub> ]	<b>c, t</b> , стабильны	Skvortsov et al, 2002
(-)-[Pt(MTSO)NH <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> ]	<b>c</b> , стабилен	Skvortsov et al, 1999
[Pt(Ph <sub>3</sub> PS)(DMSO)Cl <sub>2</sub> ]	<b>c</b> ← <b>t</b>	Skvortsov et al, 2006
(-)-[Pt(Ph <sub>3</sub> PS)(MTSO)Cl <sub>2</sub> ]	<b>c</b> ← <b>t</b>	Skvortsov et al, 2006
[Pt(TDG) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	<b>c</b> ← <b>t</b>	не опубли.
(-)-[Pt(NOBI)(DMSO)Cl <sub>2</sub> ]	<b>c</b> ↔ <b>t</b> , <b>t</b> > <b>c</b>	Скворцов и др, 2010
(-)-[Pt(NOBI)(DESO)Cl <sub>2</sub> ]	<b>c</b> ↔ <b>t</b> , <b>t</b> > <b>c</b>	Скворцов и др, 2010

Примечания. \* Обозначения: DMSO – диметилсульфоксид, DESO – диэтилсульфоксид, MTSO – метил-*n*-толилсульфоксид (свободный лиганд – (+)-*R*-энантиомер), Ph<sub>3</sub>PS – трифенилфосфинсульфид, NOBI – нобин, (-)-*S*-2-амино-2'-гидрокси-1,1'-бинафтил, Py – пиридин, TDG – тиодигликоль S(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>. † **c** и **t** – *цис* и *транс*-изомеры, отмечено наличие и преимущественное направление равновесной изомеризации по данным ЯМР и оптической спектроскопии.

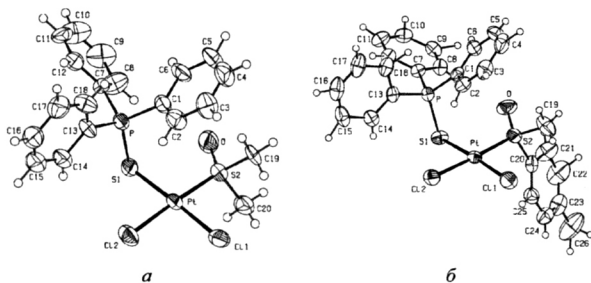


Рис 5. Молекулярная структура и абсолютная конфигурация *цис*-[Pt(Ph<sub>3</sub>PS)(DMSO)Cl<sub>2</sub>] (а) и (-)-*цис*-[Pt(Ph<sub>3</sub>PS)((*S*)-MTSO)Cl<sub>2</sub>] (б); ORTEP-эллипсоиды соответствуют вероятности 0.5.

Для смешанных (*S*, *N*)-комплексов с небольшими *N*-донорными лигандами (NH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>Me, Py) геометрические изомеры устойчивы. Комплексы с двумя *S*-донорами подвергаются динамической изомеризации; в исследованных соединениях *цис*-(*S*, *S*)-изомеры энергетически более выгодны. (*S*, *N*)-комплексы с объемным *N*-донорным лигандом (нобином) также подвергаются изомеризации, в этом случае *транс*-изомер несколько более устойчив, очевидно, в силу стерических причин. Наиболее вероятным механизмом изомеризации в водной среде является диссоциация небольшого количества *S*-донора, инициирующего цепочку последовательных замещений. Даже при незначительном избытке тиоэфира над соотношением S:Pt = 2 в водной среде инициируется быстрый обмен тиоэфирных лигандов (τ ~ 1-100 мс, по динамическим эффектам в спектре ЯМР, Рис. 6), при этом комплекс с двумя

тиоэфирными лигандами в *цис*-положении остается наиболее предпочтительным.

Химическую природу сайтов *предпочтительного взаимодействия комплексов платины с альбуминами сыворотки человека и быка* устанавливали кинетическим методом с использованием комплекса-зонда  $[\text{Pt}(\text{MTSO})\text{PyCl}_2]$  (Skvortsov et al., 2002).

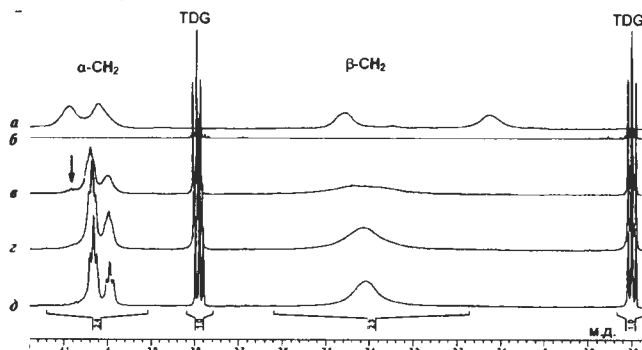


Рис 6. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 700 МГц) иллюстрирующие динамический обмен лигандов в тиоэфирных комплексах платины. (а) и (б) – исходные *цис*- $[\text{Pt}(\text{TDG})_2\text{Cl}_2]$  и TDG при 30 °С, (в)–(г) – смесь  $[\text{Pt}(\text{TDG})_2\text{Cl}_2]$  и TDG 1:1 при 30, 40 и 50 °С соответственно. Отнесение триплетов  $\alpha\text{-CH}_2$ , слева направо: *транс*- $[\text{Pt}(\text{TDG})_2\text{X}_2]$  (отмечен стрелкой), *цис*- $[\text{Pt}(\text{TDG})_2\text{X}_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{TDG})_3\text{X}]$ , ( $\text{X} = \{\text{Cl}, \text{H}_2\text{O}, \text{OH}\}$ ).

Предпочтительными сайтами являются остатки Met, экспонированные на поверхность белковой глобулы (1-3 на молекулу белка). В полном соответствии с наличием видоспецифических остатков Met, кинетики взаимодействия альбуминов человека и быка различны.

*Взаимодействие цисплатина и его неактивного изомера транс-ДДП с гистоновыми белками* исследовано по динамике изменений вторичной структуры (спектры КД). Наблюдались как стабилизация, так и дестабилизация  $\alpha$ -спиральной конформации белка. Процесс платинирования лимитирован стадией гидролиза, скорость платинирования коррелирует по рангу с количеством серосодержащих а. о. в белках и в целом ниже, чем скорость платинирования ДНК. Это подтверждает значительную роль электростатического взаимодействия при платинировании (активированные формы цисплатина, как и гистоновые белки, заряжены положительно).

*Взаимодействие цисплатина с метионином (L-Met)* изучалось на модельных системах при различных соотношениях S/Pt, концентрациях СГ и температурах методами оптической спектроскопии с МРК. Также использовались аналоги метионина с блокированной аминокгруппой. Суммируя полученные результаты с данными литературы, можно заключить, что взаимодействие цисплатина со свободным L-Met содержит, как минимум, 6 стадий в соответствии с наличием в метионине S- и N-донорных групп. Первой стадией является гидролиз цисплатина, ионы СГ конкурентно тормозят первую стадию, смещая равновесие гидролиза влево. По этой причине реакции цисплатина во внеклеточной

жидкости затруднены, но не блокируются полностью. Второй стадией является вхождение в комплекс первой молекулы *L*-Met. Следующей стадией является быстрое вхождение в комплекс второй молекулы *L*-Met в *транс*-положении к первой. *Транс-цис* изомеризация комплекса происходит быстрее, чем хелатирование, в соответствии со свойствами комплексов с двумя *S*-донорами, исследованными выше. Хелатное связывание молекул метионина происходит уже из более лабильного *цис*-интермедиата. В целом ход реакции находится под кинетическим, а не под термодинамическим контролем.

Конкуренцию между реакциями цисплатина с метионином и с ДНК исследовали *in vitro* с помощью изменений УФ-спектра в полосе поглощения ДНК и, независимо, по изменению подвижности платинированной плазмидной ДНК (Рис. 7).

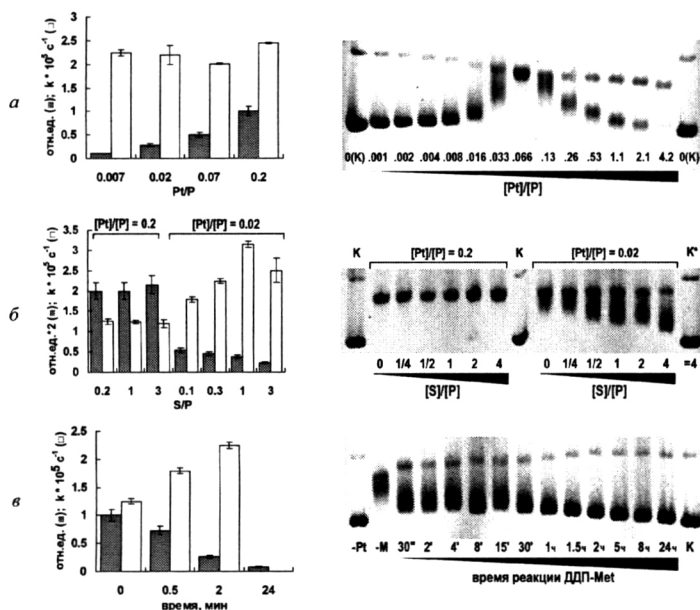


Рис 7. Конкуренция между реакцией цисплатина с *L*-метионином и процессом платинирования ДНК, 37 °С,  $[Cl^-]$  10-15 мМ. Слева – результаты МРК кинетической серии УФ-спектров поглощения ДНК (ДНК тимуса телят,  $\sim 10^7$  Да), (■) – доля спектральных изменений, отражающих образование бифункциональных аддуктов, (□) – эффективная константа псевдопервого порядка скорости изменений спектра,  $\times 10^5$ ; указаны регрессионные ошибки. Справа – изменение электрофоретической подвижности форм плазмидной ДНК pUC19, 1.5% агарозный гель, окраска EtBr. (а) – ДНК+цисплатин (контроль). (б) система [ДНК+*L*-Met]+цисплатин (одновременное начало реакций). (в) – система [*L*-Met+цисплатин]+ДНК (ДНК добавляется к системе *L*-Met-цисплатин через указанный интервал времени,  $[Pt]/[P]/[S]=1/4.8/10$ ).

В качестве критериев эффективности платинирования ДНК были выбраны компонента спектральных изменений, соответствующая образованию аддуктов

в системе ДНК-цисплатины, и константа скорости спектральных изменений. При одновременном смешивании трех компонентов *L*-Met не влияет на процесс платинирования ДНК при высоких концентрациях платины и в концентрационно-зависимой манере подавляет его при низких концентрациях платины (Рис. 7-б). При добавлении к цисплатину *L*-Met за определенное время до ДНК *L*-Met подавляет платинирование ДНК, эффект усиливается при увеличении времени реакции с метионином (Рис. 7-в). Характерные ДНК-повреждающие свойства цисплатина существенно ослабляются через 2 ч и полностью подавляются через 24 ч. При этом *L*-Met увеличивает суммарную скорость образования ДНК-аддуктов, но уменьшает долю цитотоксических аддуктов (вызывающих изменение подвижности кольцевой ДНК и характерные изменения спектра ДНК). Механизм наблюдаемых явлений, учитывающий полученные выше закономерности реакций комплексов платины с *S*-донорами, приведен на рис. 8. Цисплатин **I** через лимитирующую стадию гидролиза конкурентно взаимодействует с ДНК или тиозефирной группой (*a*). В образованном смешаннолигандном комплексе **II** быстро замещается лиганд в *транс*-положении к тиозефирной группе метионина (*б*). *Транс*-(*S*, *S*)-комплекс **III** динамически изомеризуется (*в*) в *цис*-изомер **IV**, который затем быстро теряет оставшиеся исходные лиганды (*з*); в случае свободного *L*-Met это происходит за счет хелатирования. Образование цитотоксических аддуктов к ДНК из состояний **III-V** (характерное время их появления при 37 °C составляет ~2 ч) уже не происходит, так как необходимые для этого лиганды потеряны.

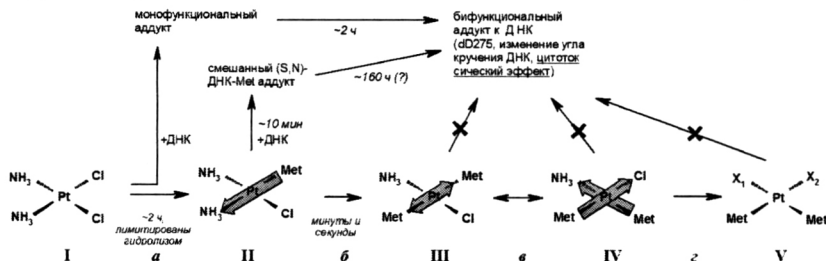


Рис 8. Схема взаимодействия комплексов платины с ДНК и остатками метионина в конкурентных условиях. Отмечено характерное время некоторых стадий при 37 °C *in vitro* (наши данные и данные литературы). Широкими серыми стрелками условно обозначен *транс*-эффект *S*-донорных лигандов.

Наблюдаемое увеличение скорости изменений спектра ДНК обусловлено образованием в ДНК смешанных Pt-*L*-Met-ДНК монофункциональных аддуктов из интермедиата **II**. В силу *транс*-эффекта они формируются быстрее, чем бифункциональные аддукты, но не превращаются в последние за биологически релевантное время.

По исследованию комплексов платины и кинетики их реакций с *S*-донорами можно сделать заключение, что теоретические посылки, положенные в основу модели взаимодействия цисплатина с медьсвязывающими мотивами *N*-конца CTR1 имеют экспериментальное подтверждение:

- 1) Активированная акваформа цисплатина эффективно связывается с остатками Met в белках, кинетически предпочитая их другим нуклеофильным центрам.
- 2) Электростатическое притяжение локального окружения играет значительную роль в увеличении скорости взаимодействия аквакатиона с остатком Met.
- 3) Вхождение в координационную сферу первой S-донорной группы (остатка Met) вызывает лабильзацию группы в *транс*-положении, в результате скорость вхождения второй нуклеофильной группы (второго остатка Met) в координационную сферу намного выше, чем первой.
- 4) Комплексы платины(II) с двумя S-донорами легко *цис-транс*-изомеризуются, для ненапряженных геометрий *цис*-конфигурация более стабильна. Координация третьего S-донора не приводит к дальнейшей стабилизации комплекса, в результате избыток S-донора вызывает серию быстрых замещений S-донор → S-донор. Таким образом, возможно "трансхелатирование" платины остатками метионина, в результате чего атом платины может перемещаться внутри метионин-богатого канала CTR1. Однако при этом неминуемо происходит необратимая потеря исходных лигандов.
- 5) Вытеснение лигандов цисплатина при взаимодействии с S-донорами приводит к потере его способности образовывать на ДНК цитотоксические аддукты. Таким образом, взаимодействие цисплатина с медьсвязывающими мотивами CTR1 *in vitro* должно приводить к разрушению исходной координационной сферы и прочному связыванию платины с остатками Met, что подтверждается данными (Amesano et al., 2008). Это приведет к инактивации и препарата, и белка. Поскольку платина все же проникает в клетку через CTR1 и достигает ДНК, вероятно, существует фактор, препятствующий *in vivo* необратимому связыванию. В нашей концепции этим фактором является направленный поток ионов меди через CTR1.

#### 4. Животная модель грызунов с контролируемым статусом меди

Для исследования связи транспорта меди и цисплатина *in vivo*, так же как и для потенциального использования этой связи с целью влияния на фармакокинетику цисплатина, необходимы методы воздействия на статус меди *in vivo*. Этой потребности соответствует модель животных с изменяющимся статусом меди. В диссертации разработан и охарактеризован метод снижения показателей статуса меди и их последующего восстановления. Основой метода послужил способ, предложенный Schreiber с соавт. (1980), который состоит в том, что крысам в корм добавляется AgCl из расчета 50 мг в сутки на 1 кг массы тела (Ag-диета).

У взрослых крыс и мышей Ag-диета приводит к падению уровня оксидазной и ферроксидазной активности и пропорционально снижает концентрацию меди (Рис. 9, а-в). У мышей оксидазная активность исчезает быстрее, но оставшаяся концентрация меди выше. В кровотоке Ag-животных циркулируют 2 формы иммунореактивного ЦП (Рис. 9, з-д). Одна форма ЦП имеет ту же подвижность в геле, что и холо-ЦП, вторая движется медленнее и этим она напоминает апо-ЦП. Ни одна из форм не окисляет специфические для ЦП хромогенные субстраты. Содержание полипептидов ЦП в крови Ag-животных не отличается



от контрольной группы (Рис. 9, е). По данным коиммунопреципитации, нативного электрофореза, диализа и гель-фильтрации, серебро в сыворотке крови крыс преимущественно связано с ЦП (Рис. 9, ж-з). При этом относительный уровень ЦП-мРНК в печени и содержание полипептида ЦП как в аппарате Гольджи, так и в сыворотке, не меняется. Это означает, что Ag-диета вызывает потерю только той меди, которая ассоциирована с ЦП.

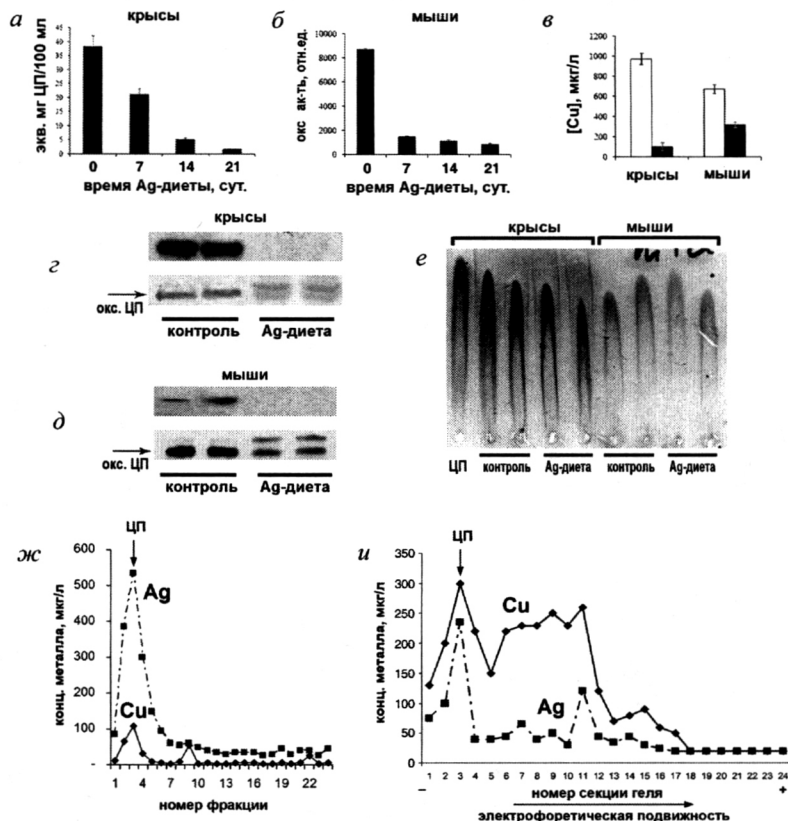


Рис 9. Влияние Ag-диеты на статус меди лабораторных грызунов. Снижение оксидазной активности ЦП сыворотки крови у крыс (а) и мышей (б), индуцированное Ag-диетой. Концентрация меди (в) в сыворотке крови контрольных грызунов (□) и Ag-грызунов через 4 недели Ag-диеты (■). Оксидазная активность, окраска о-дианизидином (верхний гель, 1 мкл сыв. на дорожку) и иммуноблот с антителами к ЦП (нижний гель, 0,5 мкл сыв. на дорожку, стрелка показывает положение зоны оксидазной активности ЦП в контроле) у контрольных и Ag-крыс (г) и мышей (д). Содержание белка ЦП, определенное методом иммуноэлектрофореза (е). У мышей (ж) и крыс (и) в сыворотке серебро ассоциировано с ЦП.

ЦП сыворотки крови Ag-крыс (Ag-ЦП) был очищен методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефарозой. Элюирование проводили ступенчатым градиентом NaCl. Полученный препарат содержит два мажорных

полипептида, которые взаимодействуют с антителами к ЦП (Рис. 10, а, б). Обе формы имеют одинаковую молекулярную массу, соответствующую полноразмерной молекуле ЦП (Рис. 10, в). Во фракциях выявляется слабая оксидазная активность, которая сохраняет каталитический характер и, в пересчете на единицу концентрации белка, снижается с номером фракции (Рис. 10-е). Оксидазная активность составляет примерно 1 – 2% от активности холо-ЦП крыс, взятого в том же количестве (Рис. 10-з). Вероятно, что во фракциях присутствует и некоторая феррооксидазная активность (Рис. 10-д).

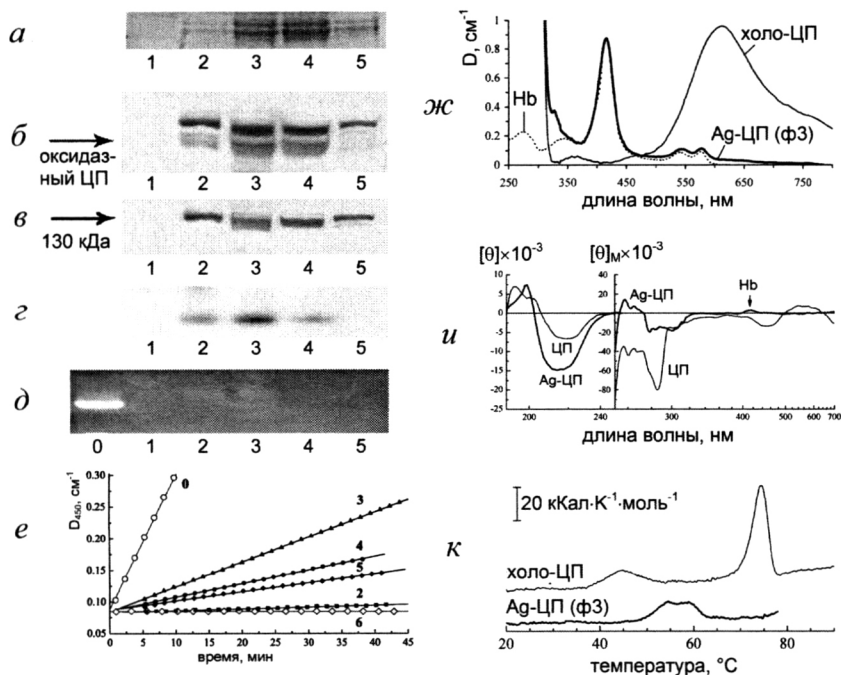


Рис. 10. Анализ фракций Ag-ЦП, полученных ионообменной хроматографией. Номер фракции соответствует повышающейся концентрации NaCl от 100 мМ (1) через 50 мМ до 300 мМ (5). (а) – электрофорез в 8% ПААГ, 5 мкл элюата на лунку; (б) – то же, иммуноблоттинг с антителами к ЦП крысы, 0,5 мкл элюата на лунку; (в) – то же, 8% ПААГ с ДСН и меркаптоэтанолом; (з) – то же, 8% ПААГ, 10 мкл элюата на лунку, окраска о-дианизидином; (д) – то же, гель окрашен на феррооксидазную активность (дорожка 0: 0,5 мкг ЦП контрольных крыс); (е) – кинетические кривые окисления о-дианизидина, 37 °С, 0: 1 г/л ЦП контрольных крыс, 2-5 – фракции Ag-ЦП, 6: 1 мМ  $\text{CuSO}_4$ ; (ж) – спектры поглощения фракции 3 Ag-ЦП; (и) – спектры кругового дихроизма фракции 3 Ag-ЦП,  $[\theta]$  – средняя молярная эллиптичность на а. о.,  $[\theta]_M$  – молярная эллиптичность белка. Hb – гемоглобин; (к) – кривые плавления препаратов ЦП (контроль, фракция 3 Ag-ЦП), скорость нагрева 1К/мин.

Выраженная полоса поглощения ЦП при 610 нм, обусловленная окисленной медью типа I, в спектрах Ag-ЦП – очень слабая и выявляется только во фракциях с наибольшей концентрацией белка (Рис. 10-ж). Уменьшение

отношения  $D_{610}/D_{280}$  в Ag-ЦП по сравнению с холо-ЦП приблизительно совпадает с уменьшением скорости катализа окисления *o*-дианизидина, таким образом, Ag-ЦП содержит 1-2% функционального холо-ЦП. Спектр КД холо-ЦП крысы почти совпадает со спектром КД ЦП человека (Noyer, Putnam, 1981). Анализ спектра КД (алгоритм CDNN) холо-ЦП крысы дает предсказание вторичной структуры 12%  $\alpha$ , 36%  $\beta$ , 17% поворотов и 35% - неупорядоченной структуры (рентгеноструктурный анализ ЦП человека: 8.4%  $\alpha$ , 34%  $\beta$  (Zaitseva et al., 1996)). Фракции Ag-ЦП обладают одинаковыми спектрами КД пептидной полосы, отличия которых от спектра холо-ЦП очевидны без количественного анализа (Рис. 10-и). Оценка содержания вторичной структуры дает 20%  $\alpha$ , 9%  $\beta$ , 20% поворотов и 51% неупорядоченной структуры. При этом Ag-ЦП не аналогичен по оптическим спектрам хорошо известным ненативным состояниям ЦП (pH-денатурированный, апо-CN-ЦП). Изменение вторичной структуры Ag-ЦП подтверждается данными дифференциальной сканирующей калориметрии, которые также указывают на меньшую энтальпию денатурации Ag-ЦП (Рис. 10-к).

*Распределение серебра в организме Ag-грызунов.* Видоспецифической разницы в распределении серебра в организме мышей и крыс обнаружено не было, поэтому в работе приводятся данные только для мышей. На рисунке 11-а показано, что серебро из AgCl абсорбируется в кишечнике и избирательно накапливается в органах. Основная масса серебра у грызунов аккумулируется в печени. Заметные количества Ag обнаруживаются в легких и селезенке. Самое высокое удельное содержание серебра выявлено в надпочечниках. В остальных исследованных органах серебро накапливается слабо. Корреляция между уровнем экспрессии CTR1 у мышей и [Ag] в органах незначительна, но положительна ( $r$ - и  $p$ -критерии +0.38 и +0.44), между [Ag] и [Cu] в органах после исключения образцов надпочечников, корреляции нет. Серебро обнаруживается в заметной концентрации в желчи Ag-мышей. Изменения концентрации меди в исследованных органах мышей и крыс под действием Ag-диеты статистически не значимы (Рис. 11-б). У лактирующих крыс, содержащихся на Ag-диете, серебро поступает в молочную железу и обнаруживается в молоке, ЦП молока Ag-крыс теряет оксидазную активность. В совокупности данные указывают на то, что маршруты Ag(I) полностью совпадают с путями транспорта меди в организме.

*Внутриклеточное распределение серебра в клетках печени Ag-мышей* было установлено по его концентрации в компартментах клетки, разделенных методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Оказалось, что большая часть серебра содержится во фракциях, соответствующих митохондриям (фракции окрашиваются MitoTracker-580 Red и содержат СОХ) (Рис. 11-в,г). В митохондриях 90% серебра сосредоточено в матриксе, причем до четверти его находится в составе низкомолекулярной диализуемой фракции. В цитозольной фракции почти все серебро связано с макромолекулами. Для клеток печени взрослых Ag-крыс наблюдались те же закономерности. Профили внутриклеточного распределения серебра в клетках

молочной железы лактирующей Ag-крысы и в клетках печени вскармливаемых ею крысят совпали с соответствующими профилями распределения меди.

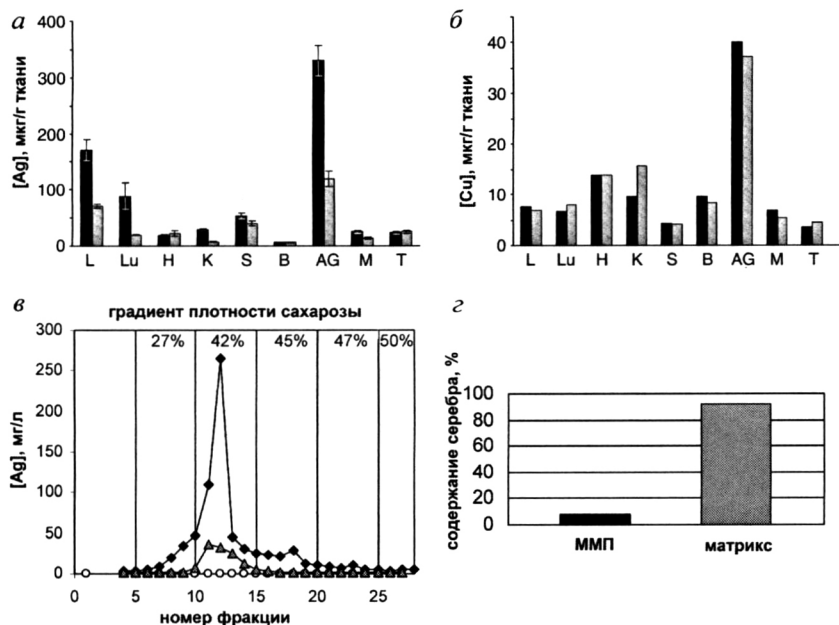


Рис. 11. Распределение серебра (а) и меди (б) в органах мышей, получавших Ag-диету в течение трех недель (Ag(+3), ■) и через 2 недели после отмены диеты (Ag(-2), ▨), L – печень, Lu – легкие, H – сердце, K – почки, S – селезенка, B – мозг, AG – надпочечники, M – скелетные мышцы, T – семенники. Профиль распределения серебра (в) в субклеточных фракциях клеток печени контрольных (○), Ag(+3)-мышей (♦) и Ag(-2)-мышей (▲). По оси абсцисс: номер фракции сахарозного градиента (1 мл), по оси ординат: концентрация серебра, вверху указано распределение концентрации сахарозы в градиенте. Распределение серебра в субмитохондриальных фракциях (г), полученных методом набухания-замораживания-оттаивания. ММП – межмембранное пространство.

Изучение влияния Ag-диеты на метаболизм меди в печени грызунов показало, что у Ag-мышей не меняется профиль экспрессии генов медьтранспортных внутриклеточных белков (CTR1, ATP7A и ATP7B), внутриклеточных купроэнзимов (SOD1 и COX), и обеих сплайс-форм ЦП-мРНК (Рис. 12, а). У Ag-мышей не меняются также относительное содержание белков CTR1, ATP7B, Cox4i1, и SOD1, активность и распределение SOD1 между цитозолем и митохондриями и скорость поглощения кислорода митохондриями в присутствии электрон-продуцирующей системы TMPD+аскорбат (характеристика активности COX) (Рис. 12, б, в).

В отделах мозга Ag-крыс, взятых нами в рассмотрение, концентрация серебра достоверно превышает фон только в гипофизе. Концентрация других биогенных d-элементов, измеренная одновременно, изменяется только в

гипоталамусе и в гипофизе: [Cu] достоверно снижается в гипоталамусе, а в гипофизе [Fe] и [Zn] соответственно повышаются в 4 и в 2 раза. Обнаруженные изменения, возможно, связаны с характерным для гипоталамо-гипофизарной системы усиленным метаболизмом меди и, соответственно, с высоким уровнем синтеза мозгоспецифических купроэнзимов.

*Восстановление статуса меди у Ag-грызунов с помощью солей меди(II).* У мышей после отмены Ag-диеты оксидазная активность сыворотки крови восстанавливается частично уже через три дня и полностью через 2 недели. Концентрация серебра постепенно снижается во всех органах (Рис. 11-а). Уровень и распределение меди в клетках печени не меняются во время Ag-диеты и после ее отмены (Рис. 11-б). Содержание серебра в митохондриальной фракции клеток печени снижается, причем оно не перераспределяется в другие компартменты (Рис. 11-в). Однократная внутривентрикулярная (в.в.), или *per os* инъекция  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10 мкг/г веса тела вызывает у Ag-грызунов форсированное восстановление оксидазной активности сыворотки крови и замещение Ag-ЦП на холо-ЦП.

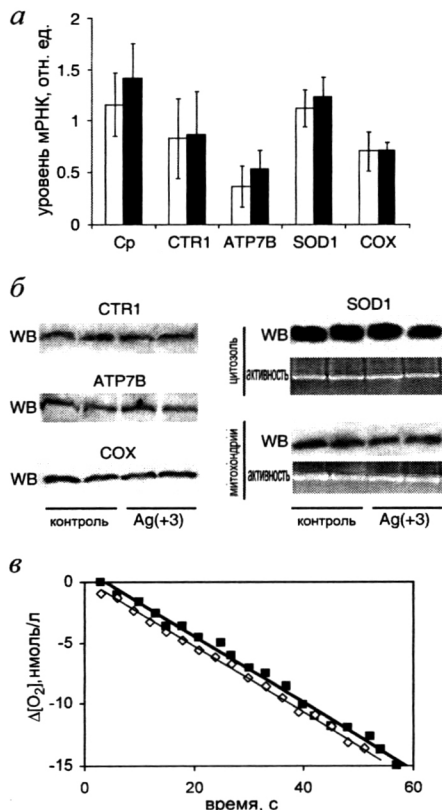


Рис. 12. Экспрессия генов медьтранспортных белков и внутриклеточных купроэнзимов в печени контрольных и Ag(+3)-мышей. (а) – полуколичественный ОТ-ПЦР анализ, (□) – контроль, (■) – Ag-мыши. (б) – иммуноблоттинг (Вестерн-блот) медьтранспортных белков и купроэнзимов в печени контрольных (дорожки 1 и 2) и Ag(+3)-мышей (дорожки 3 и 4), и активность SOD1 измеренная хромогенным методом в геле. На дорожку нанесено 30 мкг белка цитозоля (экспозиция 30 сек) или 200 мкг белка межмембранного пространства митохондрий (экспозиция – 2 мин). (в) активность COX митохондрий, выделенных из клеток печени контрольных (○) и Ag(+3)-мышей. Концентрация белка в пробах 19.6 и 19.7 мг/мл, ячейка объемом 1.3 мл содержала 1.5 мг белка митохондрий, 5 мМ аскорбата и 100 мкМ TMPD при 25 °С. Приведена кривая потребления кислорода в ячейке (калибровка – 28.53 нмоль O<sub>2</sub> на 1 мкА).

Эффект проявляется уже через 10 мин, независимо от способа введения. Через 4 ч уровень оксидазной активности сыворотки крови практически восстанавливается и остается на нормальном уровне в течение, как минимум, 72 ч на фоне продолжающейся Ag-диеты. При этом появление оксидазного ЦП в сыворотке крови происходит быстрее, чем *de novo* синтезированный [ $^{14}\text{C}$ ]-ЦП достигает кровотока. Добавление меди к препаратам Ag-ЦП не приводит к появлению у него оксидазной активности. Очевидно, введенные ионы меди(II) быстро проходят через внутриклеточную метаболическую цепь клеток печени, и встраиваются в уже имеющиеся в аппарате Гольджи полипептиды ЦП.

Обобщая данные, полученные при исследовании модели Ag-грызунов можно заключить следующее. Ag(I), вводимое в диету грызунов в виде AgCl, хорошо поглощается в ЖКТ, накапливается в печени и надпочечниках и относительно слабо проникает в органы. Результаты свидетельствуют в пользу того, что серебро доставляется Cu(I)-переносчиками кишечника и печени в митохондрии и комплекс Гольджи клеток печени, где конкурирует с медью за включение в формирующийся ЦП. В результате образуются Ag-содержащие, каталитически неактивные и неправильно свернутые молекулы ЦП, циркулирующие в кровотоке и обуславливающие низкий статус меди у Ag-грызунов. Метаболизм меди и формирование внутриклеточных купроэнзимов в печени не затрагиваются, вероятно, потому, что они высоко специфичны к окислительно-восстановительным свойствам меди, которыми Ag(I) не обладает. В условиях эксперимента мы не наблюдали дефицита внутриклеточной меди в течение месяца. Поскольку период полужизни купроэнзимов – несколько суток, в клетках, вероятно, происходит рециклирование меди. В пользу этого предположения свидетельствуют эксперименты на мышах со специфическим нокаутом CTR1 в кишечнике (Nose et al., 2006), который приводит к гибели в первые дни жизни, однако однократное в.б. введение  $\text{CuSO}_4$  после рождения полностью спасает этих мышей. Примерно такой же эффект мы наблюдаем при в.б. или *per os* введении сульфата меди Ag-животным.

Совокупность данных, представленных в этой главе, позволяет считать, что Ag-грызуны являются удачной моделью для изучения роли статуса меди в канцерогенезе и противоопухолевой терапии. Использование Ag-диеты для снижения показателей статуса меди является более предпочтительным, чем широко используемая обработка животных тетрагидромолибдатом (ТТМ), по следующим причинам:

(1) Использование Ag-диеты гарантирует синхронное и одинаковое по значению (у мышей – 60%, у крыс 90%), падение концентрации меди и нулевую оксидазную активность ЦП в сыворотке у любой по численности группы животных, без побочных токсических эффектов. Нерастворимых соединений серебра за срок эксперимента в организме не образуется. Ионы серебра остаются в обменной форме, и освобождение от них у взрослых грызунов через желчь происходит в течение нескольких дней.

(2) Природа дефицита меди точно известна. Это дефицит меди, ассоциированной с ЦП.

(3) У Ag-животных с нулевой оксидазной активностью в сыворотке крови, поддерживаемой в течение 3 недель, метаболизм меди в печени не изменяется.

(4) Статус меди может быть восстановлен в течение 4 ч однократным введением сульфата меди.

Данные по изучению действия ионов серебра на метаболизм меди у мышей и крыс согласуются с данными, подчеркивающими отличие метаболизма меди у человека и мыши. Так, у крыс и человека 90-95% внеклеточной меди ассоциировано с ЦП, у мышей – 60% (у мышей содержание ЦП относительно низкое, а 30% меди сыворотки связано с  $\alpha$ 2-макроглобулином (Cabrera et al., 2008)); для культивируемых клеток человека, но не мышей, большую биологическую ценность имеет медь, связанная с ЦП (Moriya et al., 2008). Возможно поэтому, крысы, содержащиеся на Ag-диете во время беременности, не производят жизнеспособного потомства (Шавловский и др., 1996). Напротив, мы наблюдали рождение потомства, прожившего три дня, у мышей, в течение месяца содержавшихся на Ag-диете. В этом контексте крысы являются в целом более релевантной моделью метаболизма меди у человека. Однако подавляющее большинство исследований метаболизма меди (группа линий мышей с нокаутированными генами ЦП, CTR1, COMMD1, ATP7A, ATP7B), скорости роста опухолей и противоопухолевой терапией проводится на мышах, поэтому качественное совпадение основных эффектов Ag-диеты у взрослых крыс и мышей является достоинством модели Ag-грызунов.

## **5. Использование модели серебряных грызунов для установления взаимосвязи между статусом меди и транспортом цисплатина *in vivo***

На первом этапе исследования были проведены на клеточных линиях SKOV3 и HCT116, культивируемых в средах с различным содержанием серебра (полученных бинарными разведениями среды, равновесно насыщенной Ag(I)). Хотя насыщенная серебром среда непригодна для жизни клеток, концентрации Ag(I), полностью пермиссивные для клеток, по абсолютному значению велики и имеют тот же порядок, что [Ag] в сыворотке крови Ag-мышей (~10 мкМ). Влияние Ag(I) в среде на чувствительность клеток SKOV3 и HCT116 к цисплатину противоположно (Рис. 13). Для клеток SKOV3 наблюдается слабый синергизм токсичности цисплатина и серебра, низкие концентрации серебра практически не оказывают влияния на действие цисплатина. В то же время на клетках HCT116 наблюдается увеличение устойчивости к цисплатину, наблюдаемое даже при относительно низком содержании серебра в среде; устойчивость нарастает с увеличением концентрации серебра (в пермиссивном диапазоне). Это явление подчеркивает необходимость учета всех возможных факторов, могущих влиять на транспорт цисплатина, в экспериментах на клетках. В данном случае таким фактором, вероятно, является экспрессия в клетках SKOV3 транспортера OCT2, который переносит цисплатин в клетку независимо от CTR1, меди и серебра. В клетках HCT116 белки OCT1–3 не экспрессируются и ожидаемый эффект серебра на цитотоксичность цисплатина выражен.

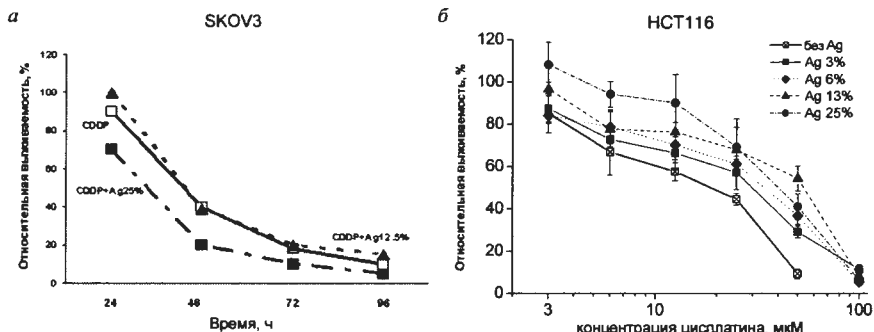


Рис. 13. Влияние ионов серебра в культуральной среде на эффективность цитотоксического действия цисплатина (0.7 мкМ) на клетки SKOV3 *in vitro* (а). Ось ординат: отношение числа живых клеток к числу клеток в контроле по результатам МТТ-анализа. Кривые доза-эффект для цитотоксического действия цисплатина на клетки HCT116 *in vitro* в присутствии ионов серебра (б). Приведено отношение количества живых клеток к числу клеток в соответствующей среде без цисплатина (МТТ-анализ). Клетки культивировали 72 ч. Шкала концентраций цисплатина – логарифмическая.

Исследования *in vivo* на крысах показали, что введение LD<sub>50</sub> (7 мг/кг) цисплатина Ag-крысам приводит к большей смертности животных (70%) в более отдаленные сроки (на 6-9 дни по сравнению с контрольной группой, в которой погибло 50% крыс на 3 день), причем эффект проявляется только при достижении полного дефицита ЦП-ассоциированной меди. При этом через 40 мин. после инъекции концентрация платины в сыворотке крови Ag-крыс достоверно выше, а в органах – ниже, чем у контрольных крыс (Рис. 14-а). У Ag-мышей через 30 мин. после введения пермиссивной дозы (4 мг/кг) цисплатина наблюдается аналогичное, хотя менее выраженное, соотношение. В печени и почках Ag-мышей на сроке 30 мин. наблюдается снижение концентраций тотальной и связанной с ДНК по сравнению с контролем (Рис. 14-б). В наших экспериментах, в соответствии с известной фармакокинетикой цисплатина, платина значительно накапливается в почках, печени, легких, семенниках, слабо поступает в мышцы, и почти не проникает в мозг; в моче и мочевом пузыре содержание платины в первые 30 мин. достигает экстремальных значений (которые у Ag-грызунов значительно ниже, чем в контрольной группе). Платина также обнаруживается в желчи, в которой ее содержание к 24 ч после введения цисплатина снижается всего на ~30% по сравнению со сроком 30 мин. (для сравнения в моче, взятой из мочевого пузыря, концентрация платины падает в 10–70 раз). С течением времени разница распределения платины между контрольными и Ag-мышьями быстро становится недостаточной. При этом в сыворотке крови Ag-мышьями происходит быстрое восстановление окислительной активности ЦП, и нарастание концентрации металлов (Cu, Ag, Fe, Zn). Фактически, у Ag-грызунов после инъекции цисплатина происходит форсированное восстановление статуса меди, аналогичное индуцированному инъекцией CuSO<sub>4</sub>.



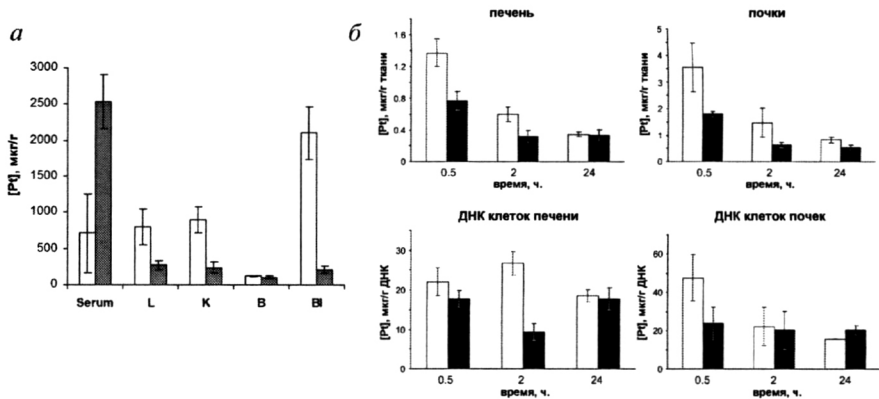


Рис 14. Распределение платины (а) в органах контрольных (□) и Ag-крыс (■) через 40 мин. после в.б. инъекции цисплатина (7 мг/кг массы тела). Обозначения Serum – сыворотка крови, L – печень, К – почки, В – мозг, В1 – мочевого пузыря. Указаны S.D. в группах из 5 животных. Поступление платины в клетки печени и почек (б) и количество платины, связанной с ДНК в этих органах у контрольных (□,  $n = 4$ ) и Ag-мышей (■,  $n = 4$ ) после в.б. инъекции цисплатина в дозе 4 мг/кг массы тела. ( $[Pt]$  1 мкг/г ДНК соответствует  $[Pt]/[P] \sim 10^{-6}$ )

В следующей серии опытов влияние статуса меди на проявление нефротоксических свойств цисплатина в отдаленные сроки исследовали на 4-х группах мышей линии C57Bl. Мыши контрольной группы (I) не подвергались обработке, группа (II) за 15 мин до введения цисплатина получала в.б. инъекцию 10 мкг/г  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , группу (III) составили Ag-мыши, Ag-мыши последней группы (IV) получали Ag-корм, и за 15 мин до введения цисплатина им был введен  $CuSO_4$ . Мыши групп III и IV обладали до инъекций типичным для Ag-грызунов низким статусом меди. Мышам всех групп был введен в.б. цисплатин из расчета 5 мг/кг массы тела. Затем животные были помещены в метаболические клетки, где исследовались в течение 72 ч. Мыши групп III и IV в продолжение опыта получали Ag-корм. Аналогичные группы мышей были подвергнуты анализу через 24 часа. За 72 часа мыши всех групп потеряли ~25% массы тела. Удельный объем суточной мочи с течением времени уменьшался за исключением группы IV. В этой группе концентрация креатинина в моче была ниже, чем в других группах. У мышей групп (II-IV) развилась протеинурия (концентрация белка в моче через 24 часа была в 4-7 раз выше нормы, Рис. 15-а). Это наблюдение позволяет предположить, что причина отложенной, но массовой гибели Ag-крыс от  $LD_{50}$  цисплатина (см. стр. 28) происходит из-за увеличения нефротоксического эффекта при сниженном статусе меди. Индекс массы тела к массе органа значимо отличался только для селезенки у группы (IV) на сроке 24 ч, селезенка у этих животных была аномально маленькой. Остальные исследованные показатели (индексы массы органов, pH мочи, содержание креатинина в крови) между группами различались не значимо. Большая часть платины, как и ожидалось, выводилась с мочой в первые часы после введения цисплатина, у мышей группы I этот процесс был более эффективен. Через 72 ч в моче мышей всех групп содержалось одинаково мало

платины (Рис. 15-б). Напротив, содержание платины в желчи у всех мышей увеличивалось к 72 часу и было примерно одинаковым во всех группах. В сыворотке крови мышей группы III через 24 часа после введения цисплатины концентрация платины была все еще выше, чем в группе (I), но в сыворотке крови мышей с форсированным добавлением меди (II и IV) содержание платины было еще выше (Рис. 15-в). Содержание платины в органах мышей через 24 ч значительно варьировало внутри групп. Однако во всех случаях ранги средних по группе значений  $[Pt]$  и ранги  $[Pt]$  в сыворотке крови через 24 ч, совпали:  $[Pt]_{IV} \approx [Pt]_{II} > [Pt]_I \approx [Pt]_{III}$  (Рис. 15-з). Концентрации платины в моче, образованной за первые 4 ч имели противоположные ранги. Во всех группах накопление платины в органах находилось в ранговом отношении: почки > печень > селезенка.

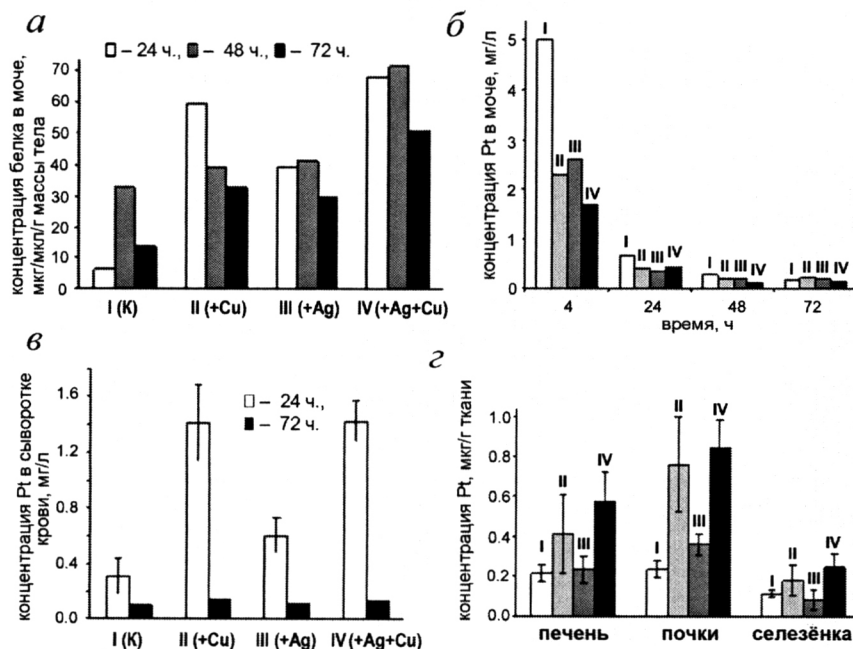


Рис. 15. (а) Концентрация белка в моче мышей групп I-IV через 24 (□), 48 (▨) и 72 (■) часа после введения цисплатины. (б) Динамика выведения платины с мочой, мг Pt/л на мыш. (в) Концентрация платины в кровотоке через 24 (□) и 72 (■) часа после введения цисплатины.. (з) Распределение платины в органах мышей через 24 часа после введения цисплатины.

Таким образом, можно заключить, что манипуляции со статусом меди в группах II-IV вызывают более тяжелую протеинурию по сравнению с группой I, однако, в остальном их влияние на отсроченные последствия действия цисплатина незначительно. При анализе распределения платины через 24 ч следует учитывать, что к этому времени неизмененный цисплатин в организме

отсутствует. Поэтому наблюдаемая [Pt] в органах соответствует в основном платине, находящейся внутри клеток и/или связанной с макромолекулами. Как показывают результаты наших экспериментов, платина содержится в желчи, и ее концентрация в желчи не снижается за время эксперимента, в то время как концентрация платины в моче быстро падает. Вероятно, в желчи содержится платина, постепенно освобождаемая из клеток за счет постепенного расщепления клетками платинированных биомacroмолекул. Природа и судьба конечных метаболитов цисплатины, в том числе из репарированных ДНК-аддуктов, практически неизвестна, но известно, что выведение платины из организма пациентов растянуто на длительный срок (Schierl et al., 1995). Данные по распределению платины в организме мышей групп I-IV полностью соответствуют нашей гипотезе о согласованном транспорте меди и платины. У мышей с повышенным содержанием меди в сыворотке (группы II и IV) поступление платины в клетки в начальный период времени после инъекции увеличивается. В результате меньшее ее количество поступает в мочу. Эффект увеличения поступления платины в органы, как и следует из нашей гипотезы, генерализованный – содержание платины в исследованных органах увеличивается пропорционально. Через 24 ч фиксируется значительно большее количество платины в органах мышей групп II и IV по сравнению с контролем I и, соответственно, большее количество вторичных метаболитов платины, выделяемых клетками в сыворотку крови. Освобождение меди из убитых цисплатином клеток восстанавливает статус меди и к 24 ч полностью нивелирует разницу между группами I и III, что и наблюдается в эксперименте. Уменьшение поступления платины в мочу в первые 4 часа после введения цисплатины в группе III, вероятно, вызвано замедлением транспорта платины при сниженном статусе меди.

На основании полученных результатов можно заключить, что дефицит ЦП-ассоциированной меди, индуцированный Ag-диетой, действительно влияет на начальную кинетику поступления платины в органы из сыворотки крови у крыс и мышей. При этом поступление платины в клетки и накопление платиновых аддуктов на ДНК в начальный период (до 30 минут) при дефиците ЦП-ассоциированной меди задерживается. Одновременно происходит прогрессивный рост концентрации меди и оксидазной активности ЦП, так что медь-дефицитное состояние быстро разрушается даже на фоне продолжения Ag-диеты. Поэтому на отдаленных сроках фармакокинетика платины у контрольных и Ag-мышей совпадает. Наоборот, введение  $\text{CuSO}_4$  за 15 мин. до введения цисплатины у мышей по последствиям соответствует увеличению количества платины, поступившей в клетки. Таким образом, результаты не противоречат нашей модели, согласно которой медь необходима для эффективного поступления цисплатины в клетку через белок CTR1. Анализ корреляции между измеренными нами уровнем экспрессии CTR1-мРНК и содержанием меди, серебра (у Ag-мышей) и платины (через 30 мин. после инъекции 4 мг/кг цисплатина у контрольных мышей) в органах подтверждает наличие многих тканеспецифических вариантов. Корреляция уровня CTR1-мРНК с [Cu], [Ag] и [Pt] в органах положительна, что согласуется с участием

CTR1 в транспорте этих металлов. Однако корреляция является далеко не полной. Это указывает на важность тканеспецифических механизмов транспорта (помимо CTR1), что делает крайне маловероятным существование какого-либо универсального решения проблем токсичности и эффективности платиновых препаратов путем воздействия только на метаболизм меди.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что CTR1 *in vivo* действительно может работать как «симпортер» меди и платины. Однако его работа контролируется множеством факторов, что может приводить к повышению поглощения цисплатина, снижению его поступления в органы и, в пределе, инактивации транспортера.

#### **6. Использование модели серебряных грызунов для установления взаимосвязи между статусом меди и ростом опухолей *in vivo***

Накоплено достаточное количество свидетельств о взаимосвязи между изменениями метаболизма меди и неопластической трансформацией, ростом, малигнизацией и метастазированием опухолей (Lowndes, Hartis, 2005). С одной стороны, это обусловлено тем, что нарушения в работе метаболизма меди могут приводить к генотоксическим эффектам, обусловленным активными формами кислорода. С другой стороны, растущим опухолям требуется медь для формирования купрозинимов постоянно увеличивающейся клеточной массы и для неоваскуляризации. Для того чтобы понять характер этой связи, была проведена следующая серия исследований.

На первом этапе был проведен мета-анализ данных реферативной базы NCBI PubMed. Поиск по ключевым словам «tumor», «copper» и «ceruloplasmin» (с синонимами) выявил 249 литературных источников. Применение критериев отбора (исследования влияния опухоли на показатели статуса меди на группе пациентов) сузило набор до 52 работ (1976-2011 г.), в котором в сумме было исследовано 3111 пациентов с опухолями. Три работы были посвящены исследованию гелатокарциномы (опухоль находится в центральном органе гомеостаза меди), в остальных был исследован широкий набор опухолей внепеченочной локализации (болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома, остеосаркома, опухоли ЖКТ, меланома, опухоли легкого, лейкомиа, первичные опухоли мозга, рак яичника, рак шейки матки, рак молочной железы, чешуйчатоклеточная карцинома, рак простаты, опухоли мочевыделительной системы). Атомная концентрация меди, содержание ЦП и активность ЦП в сыворотке крови были определены в 42 (81%), 21 (40%) и 24 (46%) работах соответственно. В подавляющем большинстве работ (48 из 52, 90%) сообщается о значимом увеличении показателей статуса меди у пациентов с опухолями по отношению к индивидуумам без опухолей. В одной работе была обнаружена различная картина для рака желудка (увеличение статуса меди) и рака кишечника (статус меди не изменен). В одной работе изменений статуса меди зарегистрировано не было, но эта работа посвящена исследованию рака слизистых полости рта, индуцированного повышенным уровнем пищевой меди и, таким образом, отличается по существу исследования. В оставшихся 2-х работах авторы не сделали выводов об изменении статусе меди. В 26 работах

(50%) указано, что увеличение показателей статуса меди имеет ценное значение для диагностики и прогноза развития опухолей. В 6 работах авторы считали, что, несмотря на увеличение статуса меди при опухолевом росте, он не имеет ценного диагностического и прогностического значения в силу низкой чувствительности и/или селективности критериев. Из 37 работ, в которых одновременно были измерены [Cu] и содержание ЦП, 4 сообщают, что при наличии опухоли соотношение [Cu]/ЦП увеличивается, 6 – о том, что оно не изменяется, в остальных этот параметр явно не анализировался. В ряде работ также сообщается, что изменения показателей статуса меди при наличии опухоли более четко выражены у мужчин, так как у женщин они подвержены влиянию эстрогенового цикла и гормональной терапии.

В следующих экспериментах в сыворотке мышей, *in vivo* выращивающих опухоли внепеченочной локализации, нами были определены показатели статуса меди. В работе использовали три модели: (1) иммунодефицитные мыши с ксенотрансплантатом опухоли кишечника человека (гетерологичная опухоль); (2) мыши, выращивающие трансплантат мышинной меланомы (гомологичная опухоль); и (3) *Min*-мыши (линия *Apc<sup>Min</sup>*, выведенная из мышей C57Bl/6J, несущая мутацию онкосупрессора APC (*adenomas polyposis coli*)). У *Min*-мышей, начиная с 60-дневного возраста, появляется до 30 и более аденом на всем протяжении кишечного тракта («аутологичная» опухоль). В опытах были использованы 70-дневные *Min*-мыши с развившимися аденомами кишечника. В качестве контроля использовали мышей соответствующих линий, которым не перевивали опухоли, а в случае с линией *Apc<sup>Min</sup>* – мышей линии C57Bl/6J. Во всех случаях мыши контрольных и опытных групп были одного возраста и пола. Данные представлены на рис. 16. Они показывают, что независимо от происхождения опухоли, в сыворотке мышей уровень оксидазной активности и содержание белка ЦП повышаются. Атомная концентрация меди увеличивается пропорционально. Дополнительно, у мышей, выращивающих опухоль из клеток HCT116, показатели статуса меди были измерены уже через неделю, когда рост опухоли находится еще в скрытом периоде. Эти показатели оказались достоверно повышенными (Рис. 16). В печени мышей всех групп были обнаружены однотипные достоверные изменения уровня экспрессии генов метаболической системы меди, вызываемые ростом опухолей. Типичные результаты (для *Min*-мышей) приведены на рис. 17. Относительный уровень содержания мРНК, кодирующей секреторную форму ЦП, повышается более чем в 2 раза. Параллельно увеличивается содержание CTR1-мРНК и ATR7B-мРНК. Неожиданно, в составе клеточной РНК обнаруживается нехарактерная для печени мРНК, кодирующая ЦП, связанный с клеточной мембраной через ГФИ-якорь, и ATR7A-мРНК, которая специфична для эмбриональной, но не для взрослой печени.

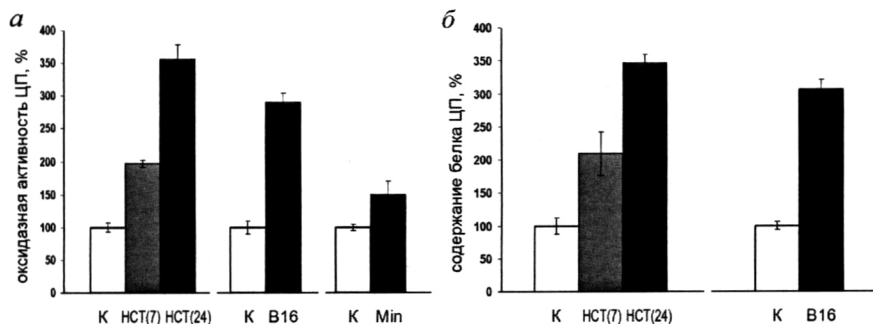


Рис. 16. Рост опухолей вызывает повышение показателей статуса меди. К – контроль, НСТ(7) – 7 дней после трансплантации клеток НСТ116, НСТ(24) – 24 дня после трансплантации клеток НСТ116, В16 – на 24 день после трансплантации клеток меланомы, Мин – 70-дневные *Min*-мыши.

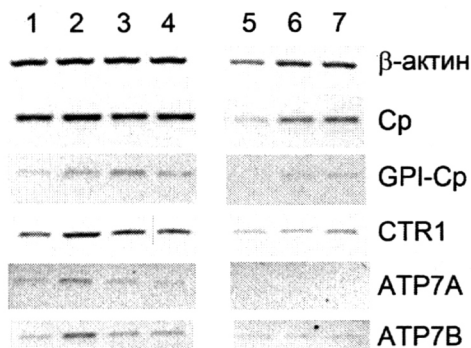


Рис. 17. В печени мышей с опухолями внепеченочной локализации повышается уровень экспрессии генов медьтранспортных белков и изменяется их профиль. 1-4: *Min*-мыши, 5-7: мыши C57Bl/6J (дикий тип по *Ape*).

Концентрация меди в печени мышей с опухолями достоверно выше, по сравнению с контролем. При этом относительное содержание внутриклеточных купрозинимов (СОД1 и СОХ) не меняется. Полученные данные позволяют заключить, что опухоли индуцируют перестройку метаболизма меди в печени, которая приводит к увеличению концентрации холо-ЦП – вероятного источника меди для опухоли и неоваскуляризации (Raju et al., 1984). Поэтому возможно, что дефицит ЦП-ассоциированной меди, может замедлить рост опухолей у *Ag*-животных. Проверку этого предположения мы осуществили на иммунодефицитных мышах CD-1 (*nu/nu*-мышях), выращивающих опухоль человека НСТ116 (карцинома кишечника) и на мышах C57Bl с мышьиной меланомой В16.

У иммунодефицитных *nu/nu*-мышей *Ag*-диета вызывала снижение статуса меди, идентичное мышам C57Bl (Рис. 18, в-г). Подсадку опухоли человека НСТ116 осуществляли мышам одновременно с началом *Ag*-диеты (*Ag*-группа), контролем служили *nu/nu*-мыши с опухолями НСТ116, не получавшие *Ag*-диету. Мониторинг размера опухоли вели 24 дня. У 5 из 6 *Ag*-мышей опухоли

не развились, рост наблюдался только у одной мыши. (Рис. 18, *a-b*). У *Ag*-мышей в опухолях концентрация меди достоверно снижалась, в цитозоле появлялись фрагменты низкомолекулярной ДНК, происходило перераспределение между цитозолем и митохондриями цитохрома *c* и HTRA2 – маркеров апоптоза, опосредованного митохондриями (Рис. 18, *e-u*).

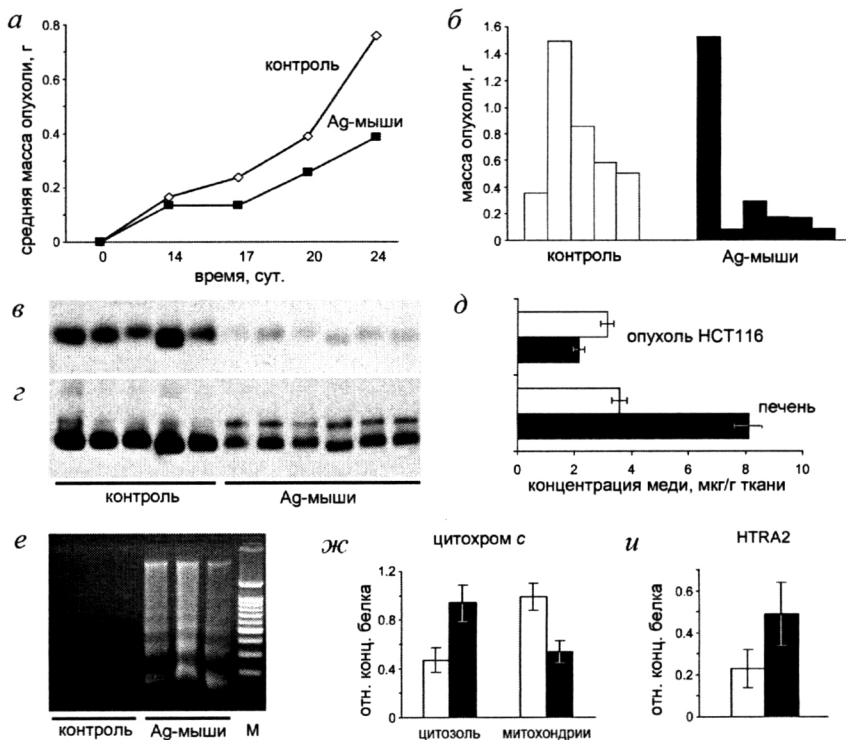


Рис 18. Развитие привитых опухолей НСТ116 у иммунодефицитных контрольных (□) и *Ag*-мышей (■). (*a*) – динамика роста опухоли, (*б*) – масса опухолей у индивидуальных животных на 24-ый день (*в*) – оксидазная активность сыворотки крови у данных животных, нативный 8% ПААГ, 0.5 мкл на дорожку, окраска *o*-дианизидином. (*г*) – иммуноблот тех же образцов, нативный 8% ПААГ, окраска антителами к ЦП человека. (*д*) – концентрация меди в опухоли и в печени. (*е*) – ДНК в цитозольной фракции клеток опухоли, 2% агарозный гель, окраска EtBr, дорожки 1–3 – контроль, 4–6 – *Ag*-мыши, 7 – маркер (100–1000 + 1500 н.п.). Содержание цитохрома-*c* (*ж*) и HTRA2 (*и*) в клетках опухоли относительно  $\beta$ -актина (цитозоль) и VDAC (митохондрии) по данным вестерн-блоттинга.

В тех же условиях эксперимента, которые вызывают подавление роста опухолей НСТ116, *Ag*-диета не влияет на рост мышинной меланомы В16. Это может происходить потому, что в сыворотке крови мышей присутствует значительный пул меди, не ассоциированной с ЦП, на который *Ag*-диета не влияет и который может использоваться клетками опухоли В16 мыши (но не клетками человека НСТ116).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа эволюционной консервативности последовательностей высокоаффинного транспортера меди CTR1, молекулярного моделирования и кинетических исследований реакций комплексов платины с серосодержащими лигандами предложена структурно-функциональная модель CTR1 как переносчика меди и известных абиогенных субстратов – серебра и цисплатина. Селекция субстратов CTR1 осуществляется, метионин-богатыми металл-связывающими мотивами внеклеточного N-концевого домена. Для эффективного связывания необходимо сочетание у иона положительного заряда и низкой жесткости по Пирсону. Этим требованиям отвечают  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$  и аквакатионы платиновых препаратов. В соответствии с закономерностями, полученными в кинетических исследованиях, связывание цисплатина метионин-богатыми мотивами CTR1 *in vitro* быстро становится необратимым, что приводит к взаимной инактивации транспортера и препарата. В качестве фактора, препятствующего *in vivo* указанной инактивации, предложено рассматривать поток ионов меди через CTR1, поскольку медь способна катализировать разрушение связей Pt–S.

Для проверки этого предположения была охарактеризована животная модель с переключаемым статусом меди, базирующаяся на введении AgCl в диету грызунов (Ag-грызуны). Показано, что ионы Ag эффективно поглощаются в кишечнике и обратимо и селективно накапливаются в органах мышей и крыс. При этом происходит замена холо-церулоплазмينا в сыворотке крови на не содержащий меди энзиматически неактивный Ag-ЦП. Токсический эффект и влияние серебра на внутриклеточный метаболизм меди отсутствуют. Статус меди может быть быстро восстановлен однократным введением соли меди(II). Результаты согласуются с предположением, что серебро переносится в организме по метаболическим путям изoeлектронного иона меди(I) и конкурентно подавляет включение меди в ЦП. Исследование распределения платины в организме Ag-грызунов после инъекции цисплатина показало, что при сниженных показателях статуса меди в сыворотке крови поступление платины в органы из кровотока у крыс и мышей задерживается. Отсроченные эффекты менее выражены, так как цисплатин индуцирует быстрый рост концентрации металлов в сыворотке крови, нивелирующий исходный дефицит меди. Изучение экспрессии гена *CTR1* в тканях мышей и крыс подтвердило, что его экспрессия носит тканеспецифический характер, меняется в онтогенезе и хорошо коррелирует с текущей потребностью тканей в меди. Корреляция между уровнем экспрессии *CTR1*, содержанием меди и накоплением серебра и платины в органах положительная, но неполная: существуют тканеспецифические варианты. Совокупность полученных результатов не противоречит предложенной гипотезе о Cu-ассоциированном транспорте цисплатина через CTR1. Тем не менее, управление статусом меди не может рассматриваться как универсальный способ воздействия на фармакокинетику платиновых препаратов. Также установлено, что рост опухолей различного происхождения сопровождается увеличением показателей статуса меди и



интенсивности метаболизма меди в печени. Снижение статуса меди с помощью Ag-диеты при ряде условий само по себе способно индуцировать апоптоз в ксенотрансплантатной опухоли у мышей.

## ВЫВОДЫ

1. Стабильная гомотримерная структура CTR1 в мембране образуется путем объединения амфипатических (нуклеофильных) поверхностей шести  $\alpha$ -спиральных трансмембранных доменов (ТМД2 и ТМД3) с образованием купрофильной поры. Удлиненный ТМД1 обеспечивает лабильность геометрии канала и сближение внеклеточных медьсвязывающих мотивов N-конца с образованием вблизи устья канала кластера тиозфирных групп, стабилизирующего ионы меди в состоянии Cu(I).
2. CTR1 участвует в транспорте абиогенных субстратов (серебро, платина). Поэтому наблюдается положительная корреляция между уровнем экспрессии CTR1 в органах мышей в разные периоды онтогенетического развития, характеризующиеся разными типами метаболизма меди, и квазистационарным уровнем меди, накоплением серебра и поглощением платины клетками этих органов.
3. В модельных системах *in vitro*, аналогичных парному взаимодействию цисплатина с медьсвязывающими мотивами CTR1, происходит быстрое замещение всех исходных лигандов препарата и потеря его специфических ДНК-связывающих свойств.
4. Модель грызунов с низким статусом меди (Ag-грызуны), получающих с пищей ионы Ag(I), изоэлектронные Cu(I), характеризуется дефицитом ЦП-ассоциированной меди, установление которого происходит синхронно и количественно воспроизводимо. Во всех органах Ag-грызунов серебро накапливается в обменной форме, статус меди восстанавливается после прекращения Ag-диеты и может быть принудительно восстановлен однократной инъекцией сульфата меди (II). У Ag-грызунов метаболизм меди в печени не нарушен, но из-за включения ионов серебра в молекулы ЦП в аппарате Гольджи в кровотоке в основном циркулирует каталитически неактивный Ag-ЦП, характеризующийся измененной третичной структурой.
5. У Ag-грызунов происходит изменение начальной фармакокинетики цисплатина: наблюдается отставание поступления платины в клетки по сравнению с контрольными животными.
6. Существует связь между статусом меди и опухолевым ростом. Рост опухолей, зависящих от ЦП, как источника меди (ксенотрансплантат опухоли HCT116 человека у *nu*-мышей) может быть подавлен у мышей, содержащихся на Ag-диете, возможно, вследствие развития апоптоза, опосредованного митохондриями.

# Публикации по теме диссертации в рецензируемых журналах

1. Самсонов С. А., Платонова Н. А., Скворцов А. Н., Цымбаленко Н. В., Васин А. В., Пучкова Л. В. Активность гена CTR1 и статус меди в различных органах крысы // Молек Биол. 2006. Т. 40, № 2. С. 239-251.
2. Samsonov S.A., Nordlund E., Platonova N.A., Skvortsov A.N., Tsybalenko N.V., Puchkova L.V. Tissue-specific *Ctr1* gene expression and *in silico* analysis of its putative protein product // AIP Conference Proceedings. From Physics to Biology: The Interface between Experiment and Computation - BIFI 2006 II International Congress. (August 24, 2006). 2006. Vol. 851. P. 185-191.
3. Skvortsov A.N., Reznikov A.N., de Vekki D.A., Stash A.I., Belsky V.K., Spevak V.N., Skvortsov N.K. Synthesis and crystal structures of platinum (II) complexes with phosphine sulfide: *cis*-Dichloro [dimethylsulfoxide] (triphenylphosphine sulfide) platinum (II) and (–)-*cis*-dichloro[(*S*)-methyl-*p*-tolylsulfoxide] (triphenylphosphine sulfide) platinum (II) // Inorganica Chimica Acta. 2006. Vol. 359, N 4. P. 1031-1040.
4. Zatulovskiy E., Samsonov S., Skvortsov A. Docking study on mammalian CTR1 copper importer motifs // BMC Systems Biology 2007, 1 (Suppl 1) : P54 (doi:10.1186/1752-0509-1-S1-P54, <http://www.biomedcentral.com/1752-0509/1/S1/P54>).
5. Клотченко С.А., Цымбаленко Н.В., Соловьев К.В., Скворцов А.Н., Затуловский Е.А., Бабич П.С., Платонова Н.А., Шавловский М.М., Пучкова Л.В., Броджини М. Влияние серебра на метаболизм меди и экспрессию генов медьтранспортных белков в печени крыс // Доклады Академии Наук. 2008. Т. 418, № 4. С. 549-552.
6. Fridman A.S., Galyuk E.N., Vorob'ev V.I., Skvortsov A.N., Lando D.Y. Melting of crosslinked DNA: VI. Comparison of influence of interstrand crosslinks and other chemical modifications formed by antitumor compounds on DNA stability // J. Biomol. Struct. Dyn. 2008. V. 26, N 2. P. 175-185.
7. Студенцов Е.П., Пискунова О.В., Скворцов А.Н., Скворцов Н.К. Синтез и оптические свойства S-нобиона // Журн. Общ. Химии. 2009. Т. 79, Вып. 5. С. 790-794.
8. Бачурина И.В., Скворцов А.Н., Скворцов Н.К., Илюшин М.А. Синтез и спектральные характеристики смешаннолигандного комплекса меди с пролином и коразолом // Журн. Общ. Химии. 2009. Т. 79, Вып. 3. С. 515-518.
9. Скворцов А.Н. Эффективный метод анализа спектров оптического диапазона в исследованиях кинетики реакций // 2009. Цитология. Т. 51, N 3. С. 229-239.
10. Скворцов А.Н., Воробьев В.И. Роль серосодержащих молекул в механизме действия платиновых противоопухолевых препаратов: исследование на модельных сульфоксидных комплексах платины // Труды Политехнического симпозиума «Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона». СПб. Изд. Политехнического ун-та. 2005. С. 88-92.
11. Скворцов А.Н., Уваров В.М., де Векки Д.А., Студенцов Е.П., Скворцов Н.К. Конформационный анализ, спектральные и каталитические свойства 1,3-тиазолидинонов при гидросилилировании ацетофенона дифенилсиланом // Журн. Общ. Химии. 2010. Т. 80, Вып. 10. С. 1652-1660.
12. Скворцов А.Н., Спевак В.Н., Студенцов Е.П., Соколова О.В., Скворцов Н.К. Синтез и спектральные свойства смешаннолигандных комплексов платины (II) с (–)-S-нобином и сульфоксидами // Журн. Общ. Химии. 2010. Т. 80, Вып. 10. С. 1697-1711.
13. Скворцов А.Н., Ильичева Е.Ю., Затуловский Е.А., Савельев А.Н., Цымбаленко Н.В., Шавловский М.М., Пучкова Л.В. 2010. Частичная характеристика церулоплазмينا крысы, выделенного из сыворотки крови животных, получавших с пищей соли серебра // Цитология. 2010. Т. 52, N 11. С. 960-966.
14. Ilyechova E., Skvortsov A., Zatulovskiy E., Tsybalenko N., Shavlovsky M., Broggini M., Puchkova L. Experimental switching of copper status in laboratory rodents // J. Trace Elem. Med. Biol. 2011. V. 25, N 1. P. 27-35.

15. Скворцов А.Н., Затуловский Е.А., Пучкова Л.В. Структурно-функциональная организация CTR1, высокоаффинного импортера меди зукариотов, определяет его способность транспортировать медь, серебро и цисплатину // Молек. Биол. 2012. Т. 46, № 1.

Публикации автора, близкие относящиеся к теме диссертации

1. Трофимов А.Е., Скворцов А.Н., Пашнова Л.В., Скворцов Н.К. Гидросилирование ангидрида эндо-цис-5-норборнен-2,3-дикарбоновой кислоты // Журн. Общ. Химии. 1998. Т. 68, Вып. 4. С. 606-614.
2. Спёвак В.Н., Лобадюк В.И., Скворцов А.Н., Коновалов В.Э., Бельский В.К., Скворцов Н.К. Спектральные свойства комплексов платины с (+)-метил-л-толилсульфоксидом. Молекулярная структура и абсолютная конфигурация (-)-трихлоро((S)-метил-п-толил-сульфоксид) платината (II) калия // Журн. Общ. Химии. 1999. Т. 69, Вып. 5. С. 745-750.
3. Скворцов А.Н. Необходимость учета анизотропии химического сдвига при изучении комплексных соединений платины. Как найти "исчезающую" константу  $J_{Pt-H}$ ? // Журн. Общ. Химии. 2000. Т. 70, Вып. 7. С. 1092-1097.
4. Чихиржина Е.В., Поляничко А.М., Скворцов А.Н., Костылева Е.И., Уссье К., Воробьев В.И.. HMG1-домены: заложники обстоятельств // Молек. Биол. 2002. Т. 36, № 3. С. 525-531.
5. Polyanichko A.M., Chikhirzhina E.V., Skvortsov A.N., Kostyleva E.I., Colson P., Houssier C., Vorob'ev V.I. The HMG1 Ta(i)le // Journ. Biomol. Struct. Dynamics. 2002. Vol. 19, № 6. P. 1053-1062.
6. Skvortsov A.N., de Vekki D.A., Stash A.I., Belsky V.K., Spevak V.N., Skvortsov N.K. Synthesis, crystal structures and optical activity of *cis*- and *trans*-( $\pi$ )-dichloro((S)-methyl *p*-tolylsulfoxide)pyridyl platinum(II) complexes // Tetrahedron: Asymmetry. 2002. Vol. 13. № 15. P. 1663 – 1671.
7. Скворцов А.Н., Заводник В.Е., Шаш А.И., Бельский В.К., Скворцов Н.К. Молекулярная структура и спектральные свойства метнионинсульфона – продукта окисления метионина // Журн. Органич. Химии. 2003. Т. 39, Вып. 2. С. 194-198.
8. Скворцов А.Н., Воробьев В.И. Численные методы анализа спектров оптического диапазона в исследованиях равновесного связывания и кинетики реакций биополимеров // Структура и динамика молекулярных систем: Сб. статей. Вып. XIII, Ч. II. Уфа: ИФМК УНЦ РАН, 2006. С. 239-244.
9. Скворцова Е.В., Скворцов А.Н., Воробьев В.И., Баянова Н.В., Тарасенко И.И., Власов Г.П. Гетеродендримеры на основе лизина и гомологичные им гиперразветвленные полимеры: физико-химические свойства и взаимодействие с ДНК // Структура и динамика молекулярных систем: Сб. статей. Вып. XIII, Ч. II. Уфа: ИФМК УНЦ РАН, 2006. С. 245-248.
10. Власов Г.П., Филиппов А.П., Тарасенко И.И., Тарабукина Е.П., Панкова Г.А., Ильина И.Е., Шпырков А.А., Скворцова Е.В., Скворцов А.Н., Воробьев В.И. Гиперразветвленный полилизин, модифицированный по концевым аминогруппам лизина остатками гистидина: синтез и структура // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2008. Т. 50, № 4. С. 589-598.
11. Скворцов А.Н. Противоопухолевая активность платиновых препаратов – нетривиальное свойство простых молекул // «Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона» Материалы конференций Политехнического симпозиума 9 дек. 2008 г. СПб. Изд-во Политехнического ун-та. 2008. С. 10-14.

## Mechanisms of Cisplatin Import into Cells Mediated by Copper Transport System

Skvortsov A.N.

Advisors: Vorobyev V.I., Puchkova L.V. Research performed in St. Petersburg State Polytechnical University, Institute of Cytology, and Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia. Dissertation defended in Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg

There is an emerging link between copper metabolism, tumor growth and mechanisms of action of platinum cytostatic drugs. CTR1, a ubiquitously expressed copper transporter was recently shown to contribute to sensitivity of cells to cisplatin. So possibilities to modulate platinum drug efficiency and selectivity by affecting copper metabolism were proposed. Yet by now there are no rational explanations for selectivity of CTR1 towards platinum drugs, or reliable means to manipulate copper metabolism. **The aim of the present work** was to develop and evaluate a model of CTR1-mediated cisplatin transport, consistent with data on CTR1 structure, CTR1 expression patterns and coordination properties of platinum adducts to proteins. *In silico* analysis of CTR1 structure in context of its function as a cuprophilic channel was performed to evaluate the mechanism of CTR1 selectivity towards copper and abiogenic substrates (silver and cisplatin). The molecular model of CTR1 homotrimer in the cell membrane was proposed. The extracellular metal-binding domains of CTR1 are formed by structurally loose clusters of nucleophilic residues, and select their substrates by positive charge and low chemical hardness. CTR1 also may facilitate copper reduction by selectively stabilizing reduced state Cu(I). CTR1 expression, studied by RT-PCR in rats and mice, is tissue specific and correlates with current requirements of tissue in copper, which comprises intracellular and secreted (ceruloplasmin) cuproenzyme synthesis. The results support the assumption that CTR1 is the most important universal copper importer. Kinetic studies of reactivity of cisplatin and newly characterized model complexes, as well as studies of complexes with S-donor ligands imply that Met-rich clusters of CTR1 N-terminus are ideal targets for cisplatin binding. However, it has been shown that binding to Met residues labilizes platinum coordination sphere and causes rapid loss of initial cisplatin ligands and cancels its binding to DNA (which is a target of cytostatic action). It has been firmly shown that there should be a factor, which prevents irreversible binding of platinum to extracellular CTR1 motifs *in vivo*. We suggest that this factor is a copper flow into the cell, as copper may catalyze breaking of Pt-S bonds. The suggestion was supported with observations of platinum distribution dynamics in rats and mice with low copper status, induced by dietary AgCl. The model with switching copper status was described extensively, and it has been shown, that dietary silver specifically damps ceruloplasmin copper pool. While silver is readily absorbed and selectively accumulated in organs, there is little impact of silver on intracellular copper metabolism and no detrimental effects on animal health. The Ag-rodent model has several experimental advantages over other models of copper deficiency, which make it valuable for future studies. Positive but incomplete correlation between CTR1 expression and copper, silver, and platinum accumulation in murine organs was observed, which is consistent with transport of these metals through CTR1. Early platinum import to cells is retarded in Ag-rodents as compared to controls, supporting the concept of copper assisted platinum transport at CTR1. At later stages the difference smoothes out, as cisplatin treatment by itself induces rapid copper release to blood serum and recovery of copper status. Increased indicators of copper metabolism in liver have been shown in tumor bearing mice. Ag-induced copper deficiency in certain cases may *per se* impede tumor growth in mice. The affected tumors exhibit low Ag accumulation, decrease of copper concentration, DNA fragmentation, and features of mitochondria mediated apoptosis. The manipulations with copper status do affect cisplatin pharmacokinetics, and there exists a positive correlation between copper level in blood serum and platinum accumulation in organs, which testifies to CTR1 as Cu-assisted Pt-importer *in vivo*. Moreover Ag-induced copper deficiency may *per se* have antitumor effect. However, many tissue and cell line specific patterns exist. So copper status should be viewed as a valuable but not a universal method to control platinum drug action or tumor growth, and further development is required for potential applications.

---

Подписано в печать 26.10.11	Формат 60x84 <sup>1</sup> / <sub>16</sub>	Цифровая Печ. л. 2.4
Уч.-изд. л. 2.4	Тираж 120	Заказ 09/10 печать

---

Отпечатано в типографии «Фалкон Принт»  
(197101, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Пушкарская, д. 54, офис 2)





10-2